

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE

PAR
JEAN-FRANÇOIS NEAULT

SYNTHÈSE ET CARACTÉRISATION STRUCTURALE DES COMPLEXES
MÉDICAMENT-ADN ET MÉDICAMENT-ARN.

23 août 1999

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

REMERCIEMENTS

L'auteur aimerait remercier son directeur de recherche le docteur H.-A. Tajmir-Riahi de même que le docteur Marc Purcell pour leur aimable collaboration à l'élaboration de ce travail. Aussi, un merci tout spécial à tous ceux et celles qui ont participé à ma formation ainsi qu'à la réalisation de mon projet de maîtrise.

RÉSUMÉ

Au cours des deux dernières décennies, la chimiothérapie a été utilisée seule ou en association avec la chirurgie, la radiothérapie et dernièrement l'immunothérapie dans le traitement des cancers. Cette méthode n'a cessé d'évoluer et a mené à de grandes améliorations dans le traitement des tumeurs, spécialement lorsque les cellules tumorales se sont dispersées partout dans le corps.

Il n'y a pas si longtemps encore, les médicaments antitumoraux étaient découverts au hasard par de vastes programmes de sélection (criblage) et dans la plupart des cas sans connaissances précises du mode d'action. De nos jours, la recherche et la formulation de nouveaux médicaments (antitumoraux) nécessitent de nouvelles méthodes permettant de déterminer le mode d'action in vitro avec leurs cibles biologiques. Ces connaissances permettent à leur tour d'améliorer le médicament en le rendant plus efficace et moins toxique tout en déterminant quelles parties des molécules sont réellement impliquées dans les interactions. Pour cette raison, la spectroscopie infrarouge par transformée de Fourier s'est avérée une méthode puissante d'analyse structurale des systèmes biologiques ainsi que de détermination des interactions intermoléculaires.

Les interactions de l'ARN (de levure: 80% ribosomal, 15% de transfert et 5% messenger) avec le diéthylstilbestrol, un œstrogène synthétique reconnu comme carcinogène, ainsi que l'ADN avec la chlorophylline, un anticancer potentiel, ont donc été étudiées en solution aqueuse, à pH physiologique pour des ratios molaires médicament/acide nucléique (r) de 1/80, 1/40, 1/20, 1/10, 1/4 et 1/2. La spectroscopie infrarouge par transformée de Fourier (FTIR), et plus précisément la technique de différence spectrale, a été appliquée afin de déterminer les modes de liaison des médicaments, la constante d'association (K), la sélectivité séquentielle, la structure secondaire des acides nucléiques de même que les variations structurales des complexes médicament-acide nucléique en solution aqueuse.

En bref, il a été démontré que pour les complexes diéthylstilbestrol-ARN, le carcinogène s'intercale dans les paires de bases guanine-cytosine et adénine-uracile à des ratios molaires de 1/80 et 1/40. A des ratios supérieurs, il y a déstabilisation partielle de l'ARN sans changement de conformation. La constante d'association s'établit à $8,50 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$.

Concernant les complexes chlorophylline-ADN, à un ratio molaire de 1/80, il a été prouvé que la chlorophylline s'intercale dans les régions guanine-cytosine et adénine-thymine. A des ratios supérieurs, une réduction partielle de l'ADN-B en faveur de l'ADN-A peut être observée. A des ratios supérieurs à 1/20, une ouverture mineure de l'hélice peut aussi être observée. La constante d'association est évaluée à $3,56 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ faisant de la chlorophylline un intercalant faible.

CHOIX DES ARTICLES

Le diéthylstilbestrol, un œstrogène synthétique, est reconnu comme étant un carcinogène chez les humains et les animaux. Il a été utilisé à travers le monde jusque dans les années soixante-dix afin de prévenir les fausses-couches. Même si son usage a été banni concernant la grossesse, il demeure toujours en usage en ce qui a trait aux déficiences hormonales. De plus, il a été prouvé que le diéthylstilbestrol marqué isotopiquement se lie à l'ADN (et donc potentiellement à l'ARN) d'une façon *in vitro* et *in vivo*. Cependant, la nature de la complexation du diéthylstilbestrol avec les acides nucléiques demeure à être investiguée.

D'un autre côté, plusieurs constituants extraits des fruits et des légumes ont été démontrés efficaces contre certaines carcinogénèses. La chlorophylle et ses dérivés possèdent des propriétés antimutagéniques contre une vaste gamme de carcinogènes potentiels. Ainsi, la chlorophylline, un dérivé de la chlorophylle, a récemment été utilisée comme inhibiteur d'hépatocarcinogénèse chez la truite arc-en-ciel.

Comme la plupart des cibles des médicaments anticancers de même que des carcinogènes impliquent l'ADN ou l'ARN, les interactions du diéthylstilbestrol avec

l'ARN et de la chlorophylline avec l'ADN revêtent une importance biologique majeure. Le choix des deux articles est donc entendu.

FORME DU MÉMOIRE

L'auteur a essayé autant que possible de respecter les normes de présentation des travaux de recherche dans les programmes d'études avancées de l'UQTR.

Cependant, les deux articles retrouvés dans ce mémoire sont présentés dans leur format original tel que lorsqu'ils ont été soumis à leur journal respectif sauf pour la numérotation des chapîtres qui a été rajoutée. Il est donc possible que la présentation ne soit pas conforme aux normes habituelles.

De plus, afin d'éviter d'alourdir le manuscrit inutilement, toutes les figures de ce mémoire se retrouvent dans la même liste. Il en est de même avec les tableaux et les schémas. Ainsi, la figure 1 du chapitre 3 sera dénotée figure 3.1 .

De même, afin d'éviter les répétitions, la partie "Introduction" ne comprendra que la théorie de base nécessaire à la bonne compréhension des articles. Plusieurs détails se trouveront donc à l'intérieur même des articles.

TABLE DES MATIÈRES

	page
Remerciements.	i
Résumé.	ii
Choix des articles.	iv
Forme du mémoire.	vi
Liste des figures.	x
Liste des schémas.	xiv
Liste des tableaux.	xv

CHAPITRE

I. INTRODUCTION

1.1	Notions sur l'ADN et l'ARN.	1
1.1.1	Structure de l'ADN et de l'ARN.	1
1.1.2	Conformations de l'ADN et de l'ARN.	5
1.2	Les modes de liaison des drogues sur les acides nucléiques.	12
1.2.1	Les liaisons aux groupements phosphates.	12
1.2.2	L'intercalation.	12
1.2.3	Les liaisons dans les gouttières.	13

1.2.4	Revue de certaines liaisons drogue-ARN et drogue-ADN	13
1.3	Notions de spectroscopie infrarouge.	15
1.3.1	Fondements de la spectroscopie infrarouge.	15
1.3.2	Utilisation du spectre infrarouge	16
1.3.3	Calcul des constantes d'affinité	19
1.3.4	Fonctionnement d'un appareil FTIR.	22
1.4	Objectifs généraux du travail	25
1.5	Bibliographie	26

2. DNA-CHLOROPHYLLIN INTERACTION

2.1	Abstract.	31
2.2	Introduction.	32
2.3	Materials and methods.	35
2.3.1	Materials.	35
2.3.2	Preparation of stock solutions.	35
2.3.3	Physical measurements.	36
2.4	Results and discussion.	37
2.4.1	DNA-CHLN Complexes	37
2.4.2	Comparisons between CHLN-DNA and CHL-DNA complexes	42
2.5	Acknowledgements	44
2.6	References.	44

3. RNA-DIETHYLSTILBESTROL INTERACTION STUDIED BY FOURIER TRANSFORM INFRARED DIFFERENCE SPECTROSCOPY

3.1	Abstract.	53
3.2	Introduction.	54
3.3	Materials and methods.	56
	3.3.1 Preparation of stock solution.	56
3.4	Results and discussion.	58
	3.4.1 RNA-DES Complexes	58
	3.4.2 Comparison Between RNA-DES and DNA-DES complexes	62
3.5	Acknowledgements.	63
3.6	References.	63

4. CONCLUSION

4.1	Survol général	70
4.2	Comparaison des complexes DES-ARN avec d'autres systèmes acide nucléique-médicament	71
4.3	Comparaison des complexes CHLN-ADN avec d'autres systèmes acide nucléique-médicament	72
4.4	Précision des mesures et validité des résultats	74
4.5	Avenir de la spectroscopie FTIR.	75
4.6	Perspectives de recherche	76
4.7	Bibliographie	77

LISTE DES FIGURES

Figure	page
1.1: Fragment d'une chaîne d'ADN: à gauche, schéma simplifié de la double hélice indiquant la petite et la grande gouttière; à droite, complémentarité des bases et anti-parallélisme des chaînes	3
1.2: Appariements de Watson-Crick: en-haut, la paire A-T; en-bas, la paire G-C.	4
1.3: Conformations B, A et Z de l'ADN vues de face et en plongée: en rouge et jaune, les paires de bases; en gris, les désoxyriboses; en blanc, les phosphates.	9
1.4: Schéma représentant la désoxyadénosine: en-haut, la conformation anti; en-bas la conformation syn	10
1.5: Arrangement tridimensionnel d'un ARN de transfert: en rouge et jaune, les paires de bases; en gris, les riboses; en blanc, les phosphates	11
1.6: Méthodologie générale d'obtention et d'interprétation des spectres de différence pour les complexes médicament – acide nucléique.	18

1.7:	Exemple d'un graphique de $1/(I-I_0)$ en fonction de $1/L$ pour la détermination de la constante d'affinité spécifique de la guanine (K_G) pour les complexes CHLN-ADN. I_0 est l'intensité initiale de la bande indicatrice pour G (1717 cm^{-1}), I est l'intensité à différentes concentrations (L) en chlorophylline.	21
1.8:	Dispositif optique et fonctionnement d'un spectrophotomètre FTIR à double faisceau.	24
2.1:	FTIR spectra (top three curves) and difference spectra [(DNA solution + CHLN solution) – (DNA solution)] (bottom four curves) of the uncomplexed calf-thymus DNA and its chlorophyllin (CHLN) adducts in aqueous solution at pH = 6.80-7.30 with different CHLN/DNA (P) molar ratios in the region $1800\text{-}600\text{ cm}^{-1}$ (the baseline are shown as broken lines).	48
2.2:	Intensity ratio variations (with respect to the reference band at 968 cm^{-1}) for several DNA in-plane vibrations at 1717 (G,T) , 1663 (T,G,A,C) , 1609 (A) , 1492 (C,G) and 1222 cm^{-1} (PO_2 stretch) as a function of chlorophyllin (CHLN) concentration (different CHLN/DNA(P) molar ratios)	49

- 2.3: Calculated distributions of the CHLN bound to the A-T (1663 cm^{-1} , mainly thymine) and to the G-C (1717 cm^{-1} , mainly guanine) regions in aqueous solution with DNA concentration of 0.025 M (phosphate) as a function of CHLN concentration (M) based on the $K = 3.56 \times 10^3\text{ M}^{-1}$ at a pigment concentration of $6.5 \times 10^{-3}\text{ M}$ 50
- 3.1: FTIR spectra (top three curves) and difference spectra [(RNA solution + DES solution) – (RNA solution)] (bottom four curves) of the free yeast RNA and its DES complexes in water-ethanol solution (50/50%) at pH = 7.30-6.80 with different drug /RNA (phosphate) molar ratios in the region $1800\text{-}600\text{ cm}^{-1}$ (the baseline shown as broken lines). 67
- 3.2: The calculated intensity ratio variations (with respect to the reference band at 913 cm^{-1}) for several RNA in-plane vibrations (cm^{-1}) at 1698 (G,U) , 1654 (U,G,A,C) , 1608 (A) , 1488 (C,G) and $1244\text{ (backbone PO}_2\text{ stretch)}$ as a function of drug concentration (different DES/RNA(P) molar ratios). . . . 68
- 3.3: Distributions of the DES bound to the G-C and A-U regions (intercalated) and the backbone PO_2 group (external binding) calculated from the relative intensities of the 1698 cm^{-1} (mainly G), 1608 cm^{-1} (mainly A) and 1244 cm^{-1}

(backbone PO_2) bands in water-ethanol solution (50/50%) at pH 7.30-6.80 with RNA concentration of 0.025 M (phosphate) as a function of DES concentration (M).	69
--	----

LISTE DES SCHÉMAS (structures)

Schéma	page
2.1: Chlorophylline.	34
3.1: Diéthylstilbestrol	55

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	page
1.1: Caractéristiques structurales des trois principales conformations des acides nucléiques: B, A et Z.	8
1.2: Fréquences d'absorption (cm^{-1}) dans l'infrarouge des principaux groupements fonctionnels.	17

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Notions sur l'ADN et l'ARN:

1.1.1 Structure de l'ADN et de l'ARN:

L'acide désoxyribonucléique (ADN) et l'acide ribonucléique (RNA) sont des polynucléotides. Chaque nucléotide contient un sucre (D-2'-désoxyribose pour l'ADN et D-ribose pour l'ARN), un groupement phosphate ainsi qu'une base azotée: adénine (A), cytosine (C), guanine (G) et thymine (T) pour l'ADN et A,C,G et uracile (U) pour l'ARN. Pour réunir les nucléotides entre eux, il s'établit des liaisons 3-5 phosphodiesters où un groupement phosphate est lié au sucre par les atomes C₃ de l'un et C₅ de l'autre. (Sarma et Sarma, 1988)

L'ADN est composé de deux chaînes de polynucléotides. Cette structure consiste en un enroulement de deux spires autour d'un axe hypothétique central (figure 1.1). Les bases de chacune des chaînes sont reliées entre elles par des liaisons-hydrogène nommées appariements de Watson-Crick. Ainsi la guanine d'une chaîne est toujours pairée à la

cytosine de l'autre tout comme l'adénine d'une chaîne est liée à la thymine de l'autre. La paire A-T présente deux liaisons-hydrogène alors que la paire C-G en présente trois (figure 1.2). Les séquences représentent l'ordre dans lequel les nucléotides se présentent. Les séquences de l'une des chaînes déterminent automatiquement les séquences de l'autre. Les deux chaînes sont donc complémentaires. En plus, elles sont anti-parallèles, ce qui veut dire que l'extrémité 3' de l'une est couplée à l'extrémité 5' de l'autre et vice versa. Il est aussi bon de mentionner que les groupements phosphates sont orientés vers l'extérieur afin de minimiser les répulsions électrostatiques. (Sarma et Sarma, 1988)

L'ARN, pour sa part, est synthétisé dans la nature sous forme d'une chaîne unique. Cependant, il se replie par la suite en une forme compacte comportant une grande partie de double-hélice mais aussi des conformations impliquant d'autres structures que les appariements de Watson-Crick dont des bouts de chaîne simple et différentes boucles. (Sarma et Sarma, 1988; Tinoco, 1986)

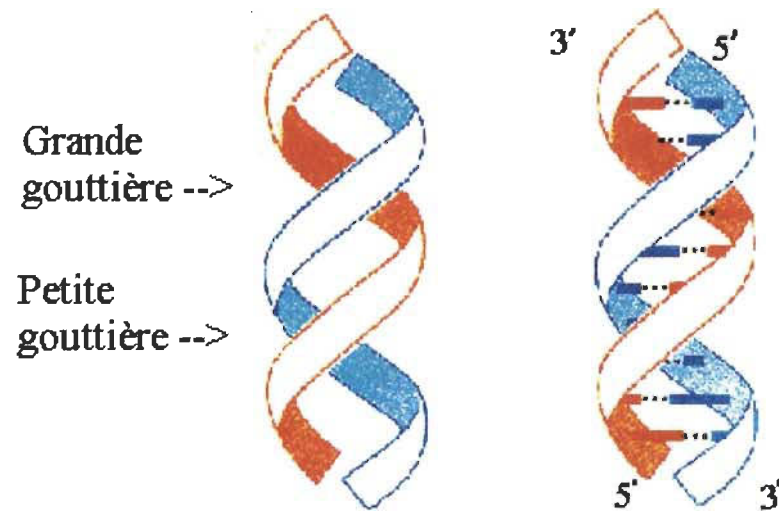


Figure 1.1 Fragment d'une chaîne d'ADN: à gauche, schéma simplifié de la double hélice indiquant la petite et la grande gouttière; à droite, complémentarité des bases et anti-parallélisme des chaînes (Sarma et Sarma, 1988).

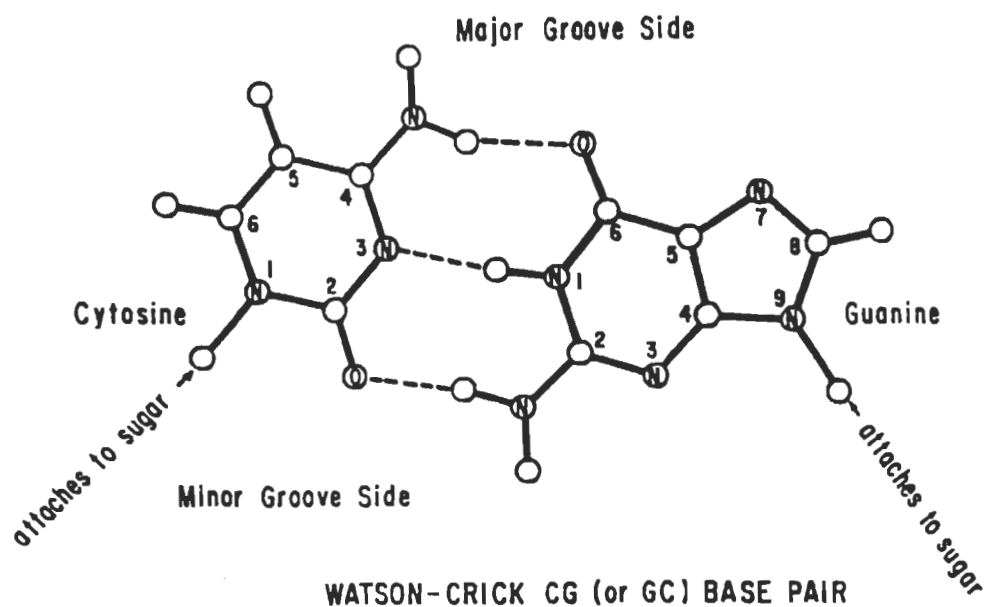
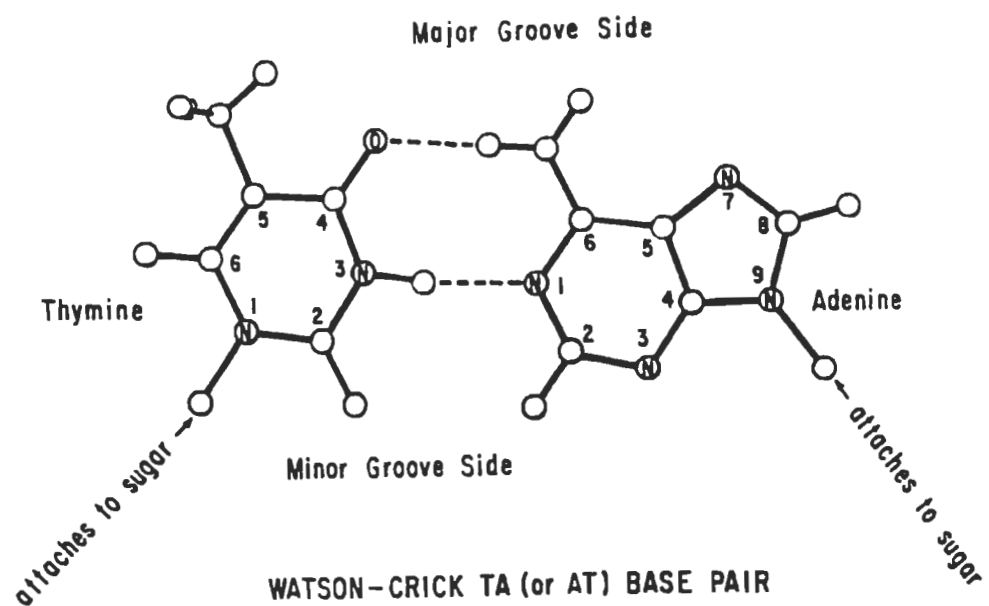


Figure 1.2 Appariements de Watson-Crick: en-haut, la paire A-T; en-bas, la paire G-C. (Sarma et Sarma, 1988)

1.1.2 Conformations de l'ADN et de l'ARN:

L'ADN présent dans les systèmes biologiques se retrouve la plupart du temps sous la conformation B. Le tableau 1.1 présente les caractéristiques structurales des trois principales conformations ; B, A et Z. De même, la figure 1.3 présente les vues de ces trois principales conformations. Les principales différences résident dans le sens d'enroulement des hélices, le nombre de nucléotides par tour d'hélice, la mesure d'un tour d'hélice, la taille des petites et grandes gouttières et la conformation du sucre. La conformation du sucre indique quel atome de carbone (du sucre) noté par un symbole " ' " se trouve hors du plan d'où le terme "endo". Le terme "anti" signifie que le lien glycosylique N9-C1' est tel que le lien C1'-O4' est en position trans par rapport au lien N9-C4 pour la désoxyadénosine, l'adénosine, la désoxyguanosine et la guanosine et que le lien C1'-O4' est trans par rapport au lien N1-C2 (le groupement $>C=O$ étant éloigné du sucre) pour la cytidine, la désoxycytidine, la thymidine, la désoxythymidine et l'uridine. Le terme "syn" signifie tout simplement que ces mêmes liens sont "cis". La figure 1.4 donne l'exemple de la désoxyadénosine avec le carbone C2'-endo anti et syn. (Sarma et Sarma, 1988)

A la surface de l'ADN B on trouve des gouttières. Une étroite (5,7 Å) et peu profonde appelée petite gouttière et une autre large (11,7 Å) et peu profonde appelée grande gouttière. Si la grande gouttière est perçue en premier plan, alors la petite gouttière est située juste derrière. Les deux gouttières sont donc les côtés opposés du mur formé par les paires de bases (figure 1.1). (Sarma et Sarma, 1988)

La double hélice de l'ADN B est stabilisée par des molécules d'eau présentes dans les gouttières de même que par les ions métalliques, généralement le Na^+ , qui sont associés aux phosphates. Il existe aussi une colonne d'hydratation composée de molécules d'eau et située dans la petite gouttière, cette colonne visant à maintenir l'intégrité de cette gouttière. Si cette colonne d'hydratation disparaît, l'ADN passe d'une conformation B à une conformation A. (Sarma et Sarma, 1988)

Dans les systèmes biologiques, l'ARN est rencontré normalement sous la conformation C. Cette conformation C est très apparentée à la conformation A de l'ADN. L'ARN est composé d'une chaîne unique. Cependant, cette chaîne unique peut se replier sur elle-même pour donner des domaines à double hélice ainsi que des boucles. L'arrangement de l'ARN n'est donc pas aussi ordonné que celui de l'ADN. La figure 1.5 nous illustre un tel arrangement. (Sarma et Sarma, 1988)

Jusqu'à ce jour, les essais visant à obtenir de l'ARN de type B ont échoués. L'ARN se dénature en chaînes simples sans passer par la forme B. Cependant, il a déjà été démontré que dans du NaClO_4 de concentration 6 M l'ARN subit un changement de conformation de C vers Z. (Tinoco, 1986)

Il est aussi important de mentionner qu'il existe trois principales fonctions pour l'ARN qui sont: messager (ARN-m), ribosomal (ARN-r), et de transfert (ARN-t). L'ADN

est confiné à l'intérieur du noyau et ne "voyage" pas. Il fait plutôt une copie du gène qu'il envoie vers les ribosomes en utilisant un messenger, l'ARN-m. L'ARN-r se retrouve dans les ribosomes (dans le cytoplasme des cellules) et a pour fonction globale de décoder l'information originellement présente dans le gène codant pour une protéine. Finalement, l'ARN-t a pour but de décoder l'ARN-m et d'apporter les acides aminés nécessaires à la synthèse des protéines. Chaque ARN-t ne reconnaît qu'un seul acide aminé. (Sarma et Sarma, 1988)

Tableau 1.1

Caractéristiques structurales des trois principales conformations des acides nucléiques: B, A et Z. (Sarma et Sarma, 1988)

Caractéristiques	Conformation-B	Conformation-A	Conformation-Z
sens d'enroulement	droit	droit	gauche
Nucléotides par tour d'hélice	10	11	12
Mesure d'un tour d'hélice	34 Å	32,7 Å	45 Å
Conformation du sucre	C2'-endo anti	C3'-endo anti	C3'-endo syn
Gouttières			
petite	profonde	Large, peu profonde	très profonde
grande	large et peu profonde	étroite, très profonde	très peu profonde

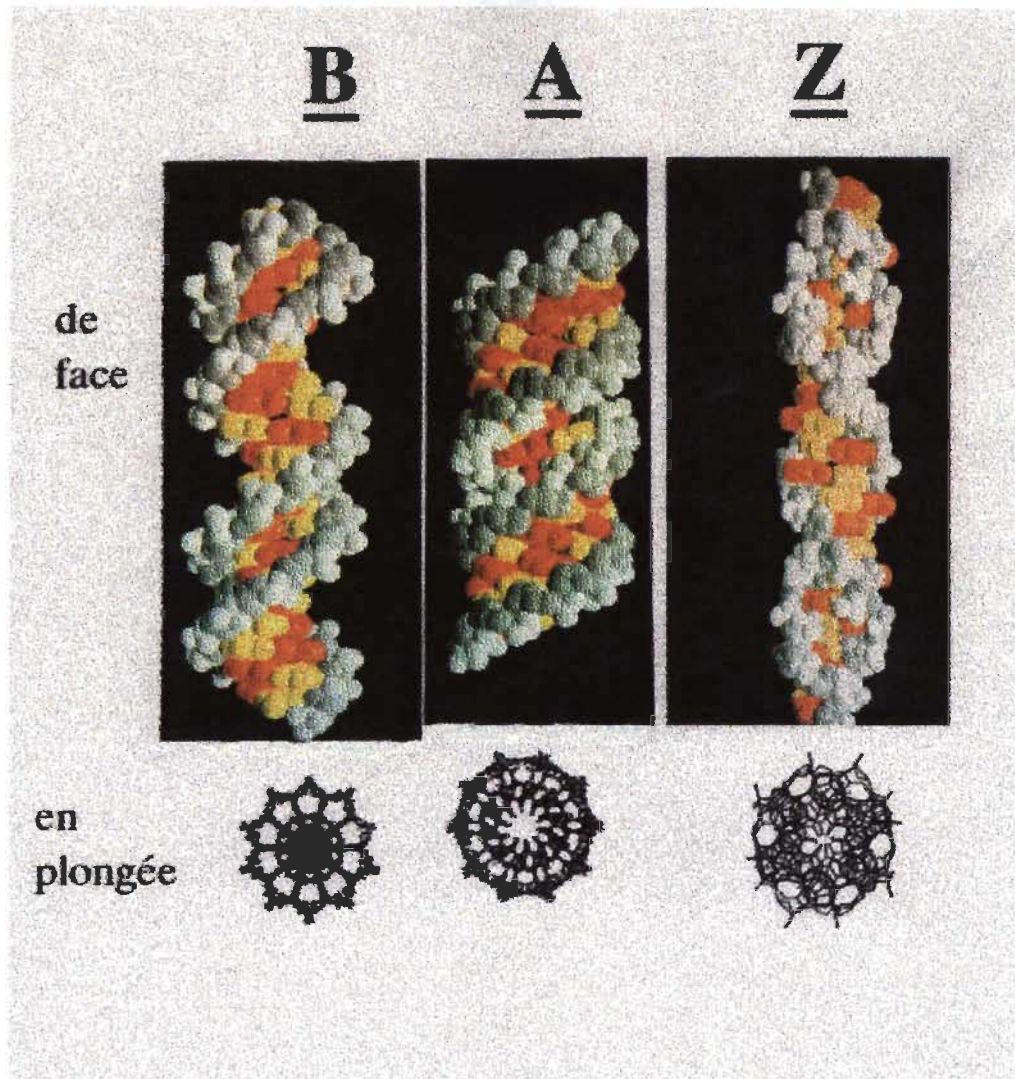
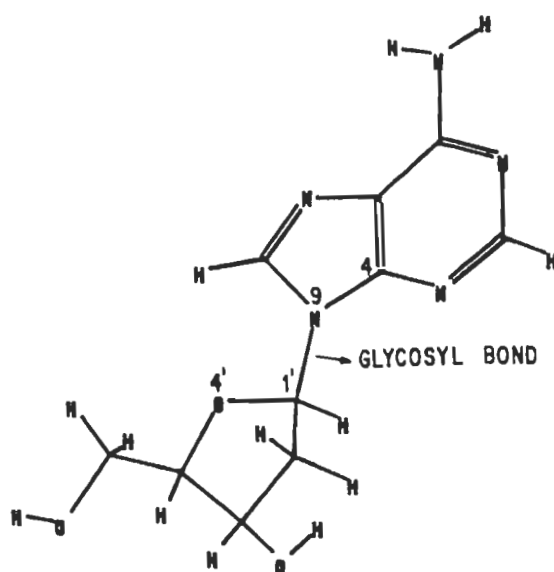
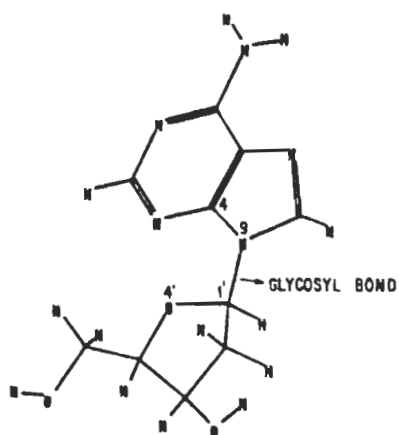


Figure 1.3 Conformations B, A et Z de l'ADN vues de face et en plongée: en rouge et jaune, les paires de bases; en gris, les désoxyriboses; en blanc, les phosphates.
(Sarma et Sarma, 1988)



ANTI CONFORMATION OF DEOXYADENOSINE



SYN CONFORMATION OF DEOXYADENOSINE

Figure 1.4 Schéma représentant la désoxyadénosine: en-haut, la conformation anti; en-bas, la conformation syn. (Sarma et Sarma, 1988)

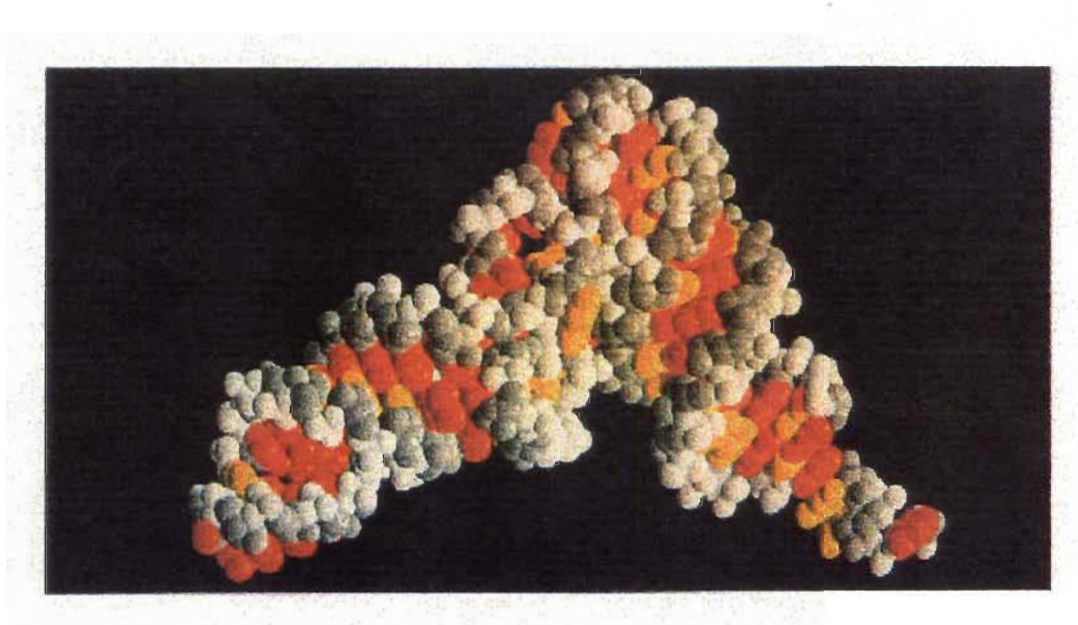


Figure 1.5 Arrangement tridimensionnel d'un ARN de transfert: en rouge et jaune, les paires de bases; en gris, les riboses; en blanc, les phosphates. (Sarma et Sarma, 1988)

1.2 Les modes de liaison des drogues sur les acides nucléiques:

1.2.1 Les liaisons aux groupements phosphates:

Plusieurs ions métalliques se lient aux groupements phosphates des acides nucléiques. Ces derniers étant situés vers l'extérieur, ils représentent souvent la première cible pour les interactions. De plus, leurs charges négatives représentent une cible de choix pour les groupements positifs dont les ions métalliques. (Sarma et Sarma, 1988)

1.2.2 L'intercalation:

La plupart des drogues possédant des cycles aromatiques plats peuvent s'incorporer entre les paires de bases créant ainsi un déphasage du cadre de lecture. L'intercalation peut être très spécifique; la drogue ne s'intercalant que dans des séquences précises. Certaines drogues possédant deux cycles aromatiques peuvent s'intercaler d'une manière telle qu'elles insèrent leurs deux cycles dans des parties différentes de l'acide nucléique. Ce phénomène est nommé bis-intercalation. (Sarma et Sarma, 1988)

La plupart des intercalants se lient à l'ADN et inhibent la réplication i.e. le dédoublement de l'ADN ainsi que la transcription i.e. la synthèse de l'ARN à partir de l'ADN. (Sarma et Sarma, 1988)

1.2.3 Les liaisons dans les gouttières:

Les gouttières sont d'une importance capitale car plusieurs drogues reconnaissent l'ADN en repérant les sites de liaison situés sur les parois. Les principaux sites sont pour la grande gouttière: a) N₇ de A; b) N₇ de G; et c) NH₂ de A et de C. Pour la petite gouttière, il s'agit de : a) O₂ et N₃H de T; b) N₁ et N₃ de A; c) O₃ et N₃ de C; de même que d) N₁H, NH₂ et N₃ de G (figure 1.2). Comme la grande gouttière de l'ADN-B est large et peu profonde, plusieurs des sites mentionnés s'y retrouvent et sont faciles d'accès. (Sarma et Sarma, 1988)

Il est aussi important de mentionner que les liaisons dans les gouttières de l'ADN s'effectuent d'une manière souvent spécifique. Par exemple, la netropsine, un antibiotique, se lie uniquement avec l'ADN-B et interagit spécifiquement avec la paire A-T. De plus, les liaisons peuvent s'effectuer avec ou sans l'intermédiaire de molécules d'eau qui peuvent former des ponts hydrogène entre la drogue et la cible biologique. (Sarma et Sarma, 1988)

1.2.4 Revue de certaines liaisons drogue-ARN et drogue-ADN:

La triostine A et l'échinomycine font partie d'une importante classe d'antibiotiques comportant deux cycles aromatiques. Ces deux molécules sont présentement utilisées en essais cliniques pour le traitement de tumeurs. Elles se lient à l'ADN et inhibent la

duplication et la transcription. Cette liaison est hautement spécifique, les drogues intercalant leur deux cycles aromatiques dans la petite gouttière d'une telle façon qu'on retrouve le duplexe C-G - G-C entre les deux cycles. L'ADN n'apparaît plus comme une spirale mais bien comme une échelle un peu tordue. A partir des connaissances détaillées concernant les interactions de la triostine A, il a été suggéré qu'un analogue de cette dernière possédant une partie peptidique en feuillets- β pourrait interagir d'une manière spécifique dans la petite gouttière de l'ADN. (Sarma et Sarma, 1988)

Parmi les carcinogènes qui établissent des liaisons covalentes avec l'ADN se retrouvent les amines aromatiques 2-acétylamino fluorène (AAF) et 2-amino fluorène (AF). Ces carcinogènes forment des complexes en se liant au carbone C8 de la guanine abolissant ainsi les interactions d'empilement de type π - π entre les cycles aromatiques des bases C et G. L'ADN devient alors distorsionnée dans la région où le carcinogène est lié. Lorsque l'AAF ou l'AF attaque le carbone C8, la guanine change sa conformation d'anti pour syn. L'ADN passe ainsi d'une conformation B à une conformation Z. (Sarma et Sarma, 1988)

Finalement, il ne faudrait pas aussi oublier la nétrropsine qui est un antibiotique antitumoral qui a été l'objet de plusieurs travaux de recherche. Différemment de la plupart des médicaments se liant à l'ADN, la nétrropsine ne s'intercale pas mais se lie d'une manière très spécifique aux paires A-T par les petites gouttières. Les atomes O2 de T et N3 de A

interagissent directement avec les groupements NH de la n tropsine (Sarma et Sarma, 1988).

1.3 Notions de spectroscopie infrarouge:

1.3.1 Fondements de la spectroscopie infrarouge:

Toute molécule organique ou inorganique qui a des liaisons covalentes absorbe les radiations électromagnétiques à différentes fréquences dans le domaine de l'infrarouge. En biophysique, on s'intéressera davantage au domaine de l'infrarouge moyen pour lequel les longueurs d'onde " λ " sont situées entre 600 et 5000 cm^{-1} . (Pavia et col.,1979)

Toute molécule excitée par un rayonnement électromagnétique absorbe une quantité d'énergie et passe à un état excité. D'après la mécanique quantique, le processus d'absorption est quantifié et seules des fréquences particulières pourront être absorbées par la molécule. (Pavia et col.,1979)

Dans le processus d'absorption, les fréquences des radiations infrarouges co cident avec celles des fréquences naturelles de vibration des molécules. L'énergie absorbée augmente alors l'amplitude du mouvement de vibration des liaisons. Il est à noter que les liaisons ne sont pas toutes capables d'absorber l'énergie infrarouge même si la fréquence co cide parfaitement à celle du mouvement de la liaison. Seules les liaisons qui ont un

moment dipolaire sont capables d'absorber une radiation infrarouge. Des liaisons symétriques comme H_2 et Cl_2 n'absorbent pas en infrarouge. Une liaison doit présenter un dipôle électrique qui doit osciller à la même fréquence que celle de la radiation d'excitation afin que l'énergie puisse être transférée. (Pavia et col.,1979)

1.3.2 Utilisation du spectre infrarouge:

Tout comme les types de liaison admettent des fréquences de vibration différentes, le même type de liaison dans deux composés différents admettra des fréquences légèrement différentes. De même, toute molécule se retrouvant dans deux environnements différents présentera deux spectres infrarouges différents. Le tableau 1.2 donne un aperçu des fréquences d'absorption pour les principaux groupements fonctionnels. (Pavia et col.,1979)

La méthode privilégiée consistera en la technique de différence spectrale. Dans cette technique, le spectre de l'acide nucléique libre est retranché de celui du complexe [acide nucléique – médicament]. Ainsi, presque tous les déplacements de bandes de même que les variations d'intensité ainsi que les nouvelles bandes apparues sont automatiquement observées. Ces changements spectraux serviront d'information sur les groupements impliqués dans les interactions. La figure 1.6 donne un aperçu de la méthodologie générale. (Sandorfy et Theophanides, 1983)

Tableau 1.2

Fréquences d'absorption (cm^{-1}) dans l'infrarouge des principaux groupements fonctionnels.

(Pavia et col., 1979)

Fréquence (cm^{-1})						
4000	2500	2000	1800	1650	1550	650
O-H	C-H	$\text{C}\equiv\text{C}$		C=O	C=N	C-Cl
		$\text{C}\equiv\text{N}$				C-O
N-H		X=C=Y (C,O,N,S)	PEU DE BANDES		C=C	C-N
					N=O N=O	C-C

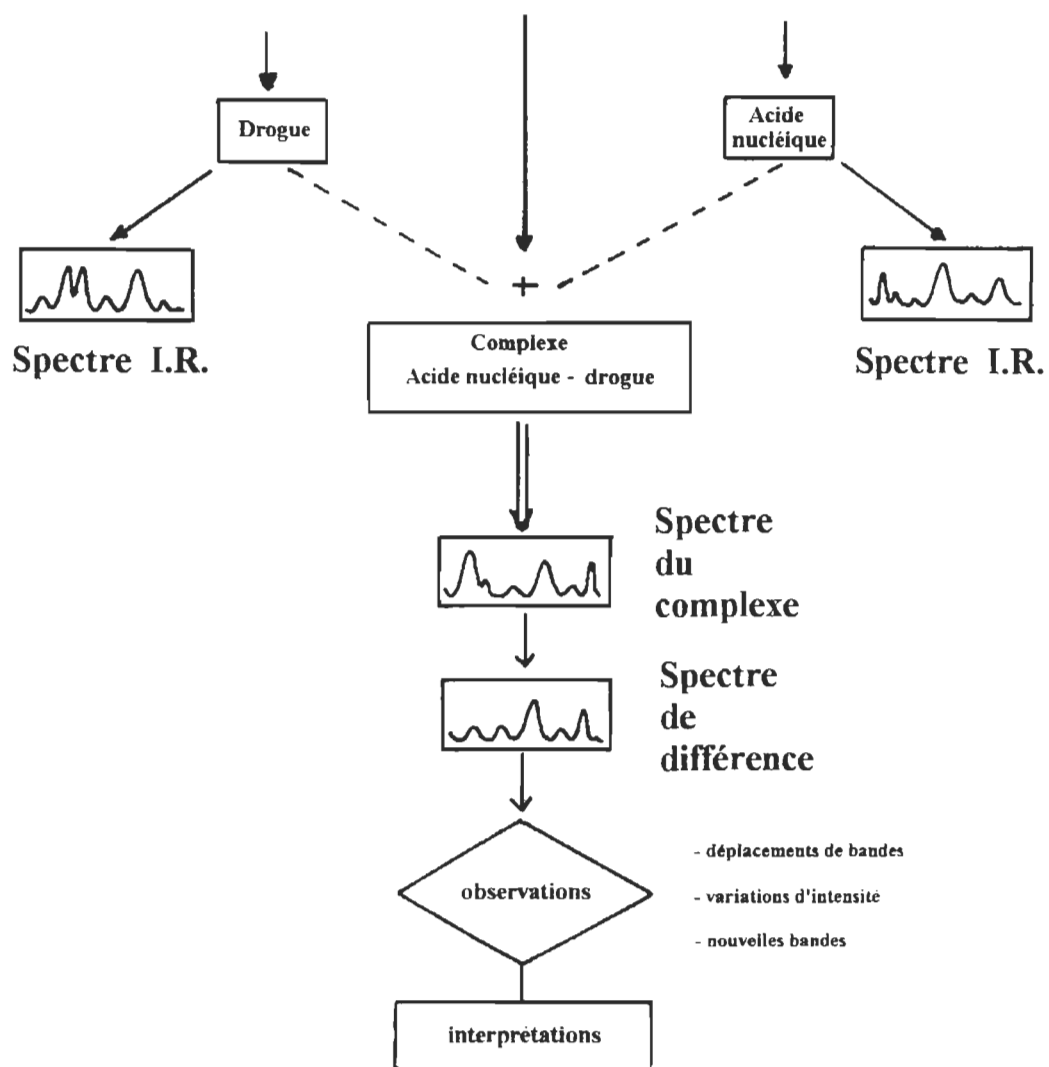
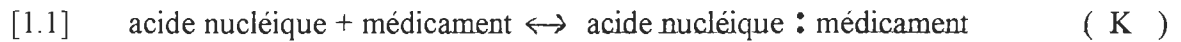


Figure 1.6 Méthodologie générale d'obtention et d'interprétation des spectres de différence pour les complexes médicament – acide nucléique. (Sandorfy et Theophanides, 1983)

1.3.3 Calcul des constantes d'affinité:

En supposant qu'il existe un seul mode d'interaction entre le médicament et l'acide nucléique, les équations suivantes peuvent être établies:



$$[1.2] \quad K = \frac{[\text{acide nucléique} : \text{médicament}]}{[\text{acide nucléique}] [\text{médicament}]}$$

Puisque l'interaction du médicament est limitée à certains sites spécifiques, la variation des intensités relatives des bandes correspondantes est utilisée afin de déterminer les constantes spécifiques à chaque site. En effectuant le graphique de $1/(I-I_0)$ en fonction de $1/L$ où I_0 est l'intensité relative de départ de la bande spécifique, I est l'intensité relative à différentes concentrations et L la concentration molaire en médicament, une droite est obtenue. Un exemple d'une telle droite est donné à la figure 1.7. La constante spécifique peut alors être calculée comme le rapport de l'intercept à la pente (Klotz et Hunston, 1971). Connaissant la concentration de chaque site de liaison, la concentration en médicament et la constante spécifique, il est alors possible de déterminer la concentration de médicament lié ($[\text{acide nucléique} : \text{médicament}]$) à un site spécifique par l'équation 1.2.

La constante globale d'affinité peut alors être estimée à partir de l'équation 1.3.

$$[1.3] \quad r/A = K(n-r)$$

Dans cette équation, r est le nombre de moles de médicament lié par mole d'acide nucléique, A la concentration molaire de molécules non-liées et n le nombre de sites de liaison (Klotz et Hunston, 1971).

Les pourcentages de distribution du médicament sur les sites de liaison sont calculés selon l'équation 1.4:

$$[1.4] \quad \% \text{ de distribution} = \frac{\text{concentration du médicament sur un site}}{\text{concentration totale en médicament au départ}} \times 100$$

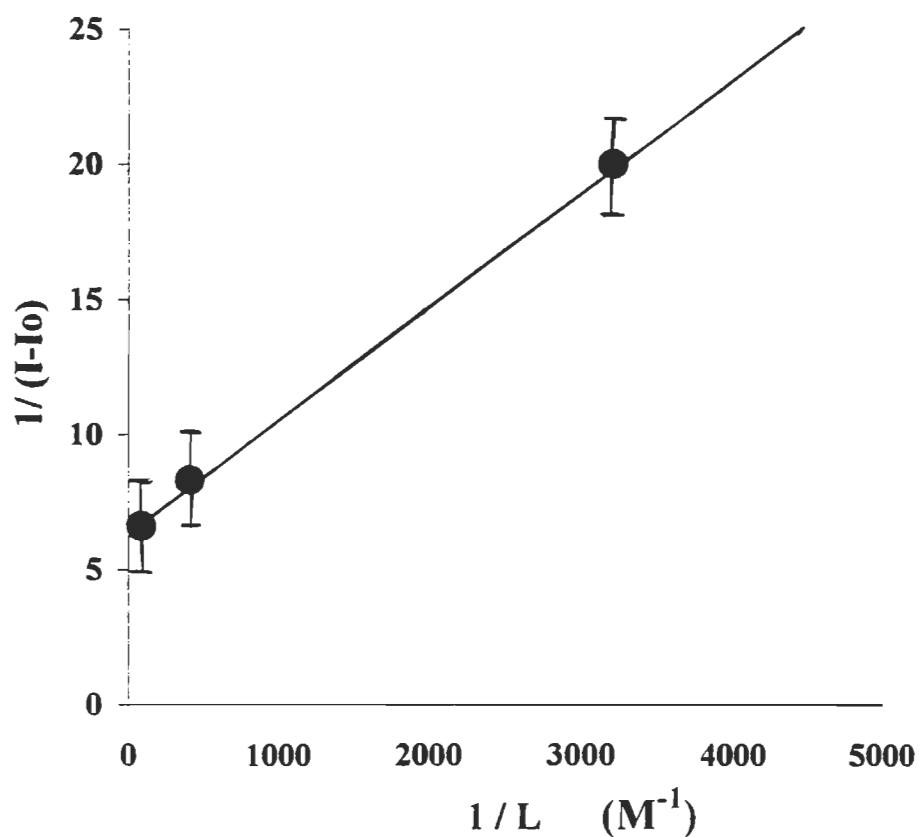


Figure 1.7 Exemple d'un graphique de $1/(I-I_0)$ en fonction de $1/L$ pour la détermination de la constante d'affinité spécifique de la guanine (K_G) pour les complexes CHLN-ADN. I_0 est l'intensité initiale de la bande indicatrice pour G (1717 cm^{-1}), I est l'intensité à différentes concentrations (L) en chlorophylline

1.3.4 Fonctionnement d'un appareil FTIR:

Un spectrophotomètre infrarouge moderne à double faisceau comporte cinq parties principales: la source de rayonnement infrarouge, le compartiment de l'échantillon, le photomètre, le monochromateur (et la lame séparatrice) et le détecteur. La figure 1.8 représente schématiquement le dispositif optique d'un tel appareil.

Les radiations provenant de la source de rayonnement infrarouge sont obtenues en chauffant électriquement de 1300 à 1500 K une baguette de globar (acétylure de cuivre). Ce procédé nécessite cependant un refroidissement à l'eau. (Skoog, 1985)

L'échantillon à être analysé est déposé entre des fenêtres de chlorure d'argent (AgCl). Ce matériau possède les caractéristiques de ne pas absorber dans l'infrarouge moyen (la zone étudiée) et d'être insensible à l'eau. Ceci est très important car la plupart des systèmes biologiques étudiés par FTIR sont en milieu aqueux. (Skoog, 1985)

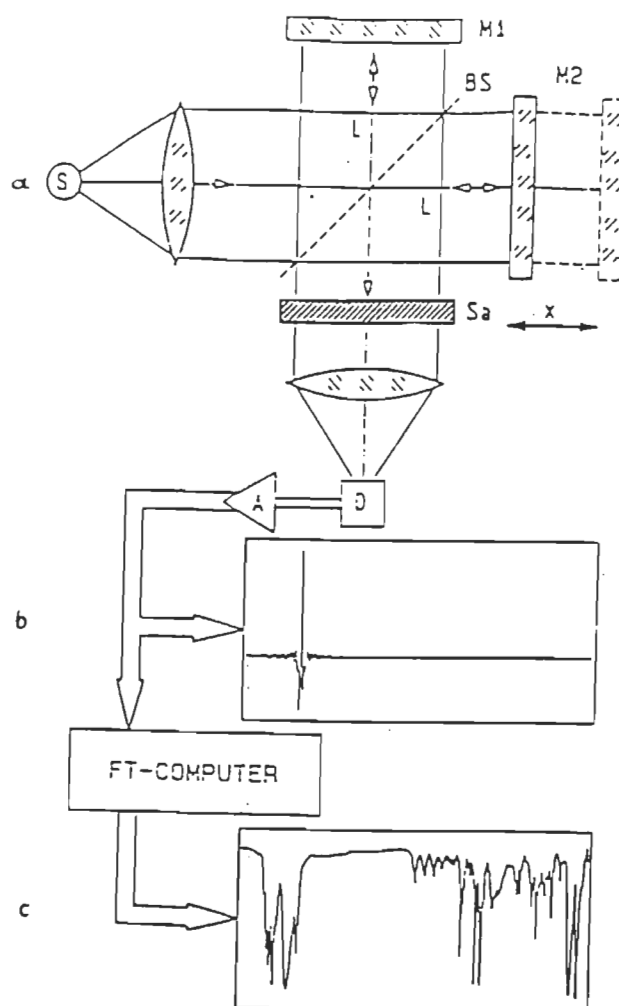
La lame séparatrice (beam splitter) est généralement construite de matériaux qui réfléchissent 50% des radiations. Dans l'infrarouge moyen, le bromure de potassium (KBr) donne des résultats très satisfaisants. (Skoog, 1985)

Généralement les détecteurs thermiques ne sont pas adaptés aux appareils FTIR à cause de leur temps de réponse trop élevé. C'est pourquoi le détecteur à photoconduction à

base de mercure/cadmium/tellure est utilisé. Ce type de détecteur doit cependant être refroidi à l'azote liquide.

Le spectrophotomètre FTIR utilisé dans ce travail fonctionne par un interféromètre de Michelson tel qu'illustré à la figure 5. Ainsi le rayonnement issu de la source traverse une distance L puis tombe sur un miroir fixe, le faisceau réfléchi parcourt une distance totale $2L$ avant de tomber à nouveau sur une lame séparatrice. Dans cette partie de l'interféromètre, le miroir mobile se déplace avec précision le long de l'axe (x). Dans ce cas, la longueur du chemin parcouru est de $2(L + x)$ et le faisceau focalisé sur la cellule porte-échantillon (S_a) est formé de deux faisceaux modulés avec une fréquence qui est fonction de la vitesse du déplacement du miroir $M1$. Le détecteur recevant alternativement le faisceau de référence et celui de l'échantillon avec une fréquence de permutation déterminée par le déplacement du miroir, toute modification de l'intensité du faisceau de l'échantillon résultant d'une absorption se traduit par un signal électrique. (Pavia et col. 1979)

Un des principaux avantages de la spectroscopie FTIR par rapport à la spectroscopie conventionnelle réside dans le fait que les balayages (scans) sont effectués simultanément réduisant de beaucoup le temps nécessaire à l'obtention d'un spectre. La technique de transformée de Fourier permet aussi de réduire de beaucoup le bruit de fond donnant ainsi des spectres plus nets. (Skoog, 1985)



- a) Schéma de l'interféromètre de Michelson, S source radiative, S_a cellule de l'échantillon, D détecteur, A amplificateur, M_1 miroir fixe, M_2 miroir mobile
 B_S lame séparatrice, X déplacement du miroir, L voir texte
- b) Signal enregistré par le détecteur D (interférogramme)
- c) Spectre obtenu par la transformée de Fourier (FT) de l'interférogramme

Figure 1.8 Dispositif optique et fonctionnement d'un spectrophotomètre FTIR à double faisceau. (Pavia et col., 1979)

1.4 Objectifs généraux du travail:

Puisque les cibles de liaison des médicaments anticancer et des carcinogènes peuvent impliquer l'ADN ou l'ARN, l'étude des interactions de l'ARN avec le diéthylstilbestrol (carcinogène) et de l'ADN avec la chlorophylline (anticancer) revêt une importance majeure. Ainsi par la spectroscopie FTIR (principalement la technique de différence spectrale) la nature des complexes CHLN-DNA et DES-RNA sera élucidée d'une manière *in vitro*.

Par la variation d'intensité (à plusieurs concentrations en médicament) de bandes indicatrices qui sont : 1717 (G), 1663 (T), 1609 (A), 1492 (C) et 1222 cm^{-1} (PO_2) pour l'ADN ainsi que: 1698 (G), 1654 (U), 1608 (A), 1488 (C) et 1244 cm^{-1} (PO_2) pour l'ARN, il sera possible d'établir quelles parties des biomolécules sont en cause dans les interactions. De même, ces variations d'intensité permettront de calculer les diverses constantes d'association ainsi qu'à déterminer les changements de conformation des biomolécules. (Tajmir-Riahi et col., 1995)

Par la méthode de différence spectrale, il sera aussi possible d'observer l'apparition de nouvelles bandes ou encore la variation de bandes existantes qui indiquent un changement d'environnement des biomolécules de même que la formation de nouveaux complexes. Finalement, l'étude combinée de la variation d'intensité et du déplacement de longueur d'onde des bandes indicatrices permettra de conclure sur le mode de liaison des médicaments (intercalation, liaisons directes, etc...). (Tajmir-Riahi et col., 1995)

1.5 Bibliographie:

Bellamy, L.J. Advances in Infrared Group Frequencies London: Chapman and Hall Ltd., 1975.

Klotz, I.M. et Hunston, D.L. Properties of graphical representations of multiple classes of binding sites. Biochemistry, 1971, 10, 3065-3069.

Lavalle, N., Lee, S.A. et Rupprecht, A. Counterion effects on the physical properties and the A to B transition of calf-thymus DNA films. Biopolymers, 1990, 30, 877-887.

Lipscomb, L.A., Zhou, F.X., Persnell, S.R., Woo, R.J., Peek, M.F., Plaskon, R.R. et William, L.D. Structure of a DNA-porphyrin complex. Biochemistry, 1996, 35, 2818-2823.

Pasternack, R.F., Gibbs, E.J. et Villafranca, J.J. Interactions of porphyrins with DNA. Biochemistry, 1983, 22, 5409-5417.

Pavia, D.L., Lampman, G.M. et Kriz, G.S. Jr. Introduction to spectroscopy. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1979.

Sandorfy, C. et Theophanides, T.(Eds.) Spectroscopy of Biological Molecules Dordrecht: D. Reidel Publishing Company, 1983.

Sarma, R.H. et Sarma M.H. DNA Double Helix & The Chemistry of Cancer Guilderland: Adenine Press Inc., 1988.

Skoog, D.A. Principles of instrumental analysis (3rd ed.). Philadelphia: CBS College Publishing, 1985.

Spiro, T.G. (Ed.) Biological Applications of Raman Spectroscopy New-York: John Wiley and Sons, 1987.

Taillandier, E., Liquier, J. et Taboury, J.A. Advances in Infrared and Raman Spectroscopy New-York: Wiley, 1985.

Tajmir-Riahi, H.A., Ahmad, R., Naoui, M. et Diamantoglou, S. The effect of HCl on the solution structure of calf-thymus DNA: a comparative study of DNA denaturation by proton and metal cations using Fourier transform infrared difference spectroscopy. Biopolymers, 1995, 35, 493-501.

Tajmir-Riahi, H.A., Langlais, M. et Savoie, R. A laser Raman spectroscopic study of the interaction of the methylmercury cation with AMP, ADP and ATP. Biochim.Biophys. Acta, 1988, 956, 211-216.

Theophanides, T. (Ed.) Fourier Transform Infrared Spectroscopy (1st ed.) Dordrecht: D. Reidel Publishing Company, 1984.

Tinoco, I. Jr Nucleic acid structures, energetics and dynamics. J.Phys.Chem., 1996, 100, 13311-13322.

Tuite, E. et Kelly, J.M. The interaction of methylene blue, azure B, and thionine with DNA: Formation of complexes with polynucleotides and mononucleotides as model systems. Biopolymers, 1995, 35, 419-433.

CHAPITRE 2

DNA-Chorophyllin Interaction

Publié dans la revue

Journal of Physical Chemistry B

1998, 102, 1610-1614

Soumis sous forme révisée le 16 octobre 1997

Publié le 11 février 1998

DNA-Chlorophyllin Interaction

Jean-F. Neault and H. A. Tajmir-Riahi*

Department of Chemistry-Biology, University of Québec at Trois-Rivières, C.P. 500, TR
(Québec) Canada G9A 5H7

Key Words: DNA; chlorophyllin; chlorophyll; drug; binding mode; conformation; helix stability; FTIR spectroscopy

The abbreviations used are: CHLN, chlorophyllin; CHL, chlorophyll; DES, diethylstilbestrol; H₂TMPyP4, tetrakis(4-N-methylpyridyl)porphyrin; FTIR, Fourier transform infrared; A, adenine; C, cytosine; G, guanine; T, thymine; r, pigment/DNA(P) molar ratio

***Corresponding Author:** Tel: (819) 376-5052 (ext. 3321);
Fax: (819) 376-5084;
E.mail: Tajmirri@uqtr.quebec.ca

2.1 Abstract:

Porphyrins and their metal derivatives are strong DNA binders with association constants of around 10^6 M^{-1} . Some of these compounds have been used for radiation sensitization therapy of cancer and are targeted to interact with cellular DNA. Chlorophyllin (CHLN), a food-grade derivative of chlorophyll (CHL), the ubiquitous green plant pigment widely consumed by humans, is a potent inhibitor of experimental carcinogenesis. The aim of this study was to examine the interaction of calf-thymus DNA with chlorophyllin in aqueous solution at physiological pH, with CHLN/DNA(phosphate) molar ratios (r) of 1/80, 1/40, 1/20, 1/10, 1/4 and 1/2. Fourier transform infrared (FTIR) difference spectroscopy was used to determine the CHLN binding mode, the binding constant, sequence selectivity, DNA secondary structure and structural variations of the DNA-CHLN complexes in aqueous solution.

Spectroscopic evidence showed that at low pigment concentration ($r=1/80$), CHLN binds DNA *via* intercalative mode into the G-C and A-T-rich regions with a minor interaction towards the backbone PO_2 group (outside binding). At $r>1/80$, a partial reduction of B-DNA structure in favor of A-DNA occurs upon drug complexation. At high drug content ($r>1/20$), a minor helix opening is observed. The calculated binding constant $K = 3.56 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ shows chlorophyllin as a weak DNA intercalator. The DNA-chlorophyllin complexation is rather different from that of the DNA-chlorophyll interaction,

in which chlorophyll binding is mainly through the backbone PO₂ group with minor cation-base interaction (groove binding).

2.2 Introduction:

Diet has been shown to play an important role in human cancer risk.¹⁴ Although much attention has been focused on dietary carcinogens and promoters, recent evidence shows that protective factors within the diet are also important in cancer risk. Several chemical components of fruits and vegetables have been isolated and purified and shown to be effective against carcinogenesis in experimental animal models.⁵⁻⁸ Chlorophyll and its derivatives have been shown to exert profound antimutagenic behavior against a wide range of potential human carcinogens.⁷⁻⁹ Similarly, chlorophyllin (Structure 1), a food-grade derivative of chlorophyll, has been used historically in the treatment of several human conditions, with no evidence of human toxicity¹⁰⁻¹² and recently it was used as a potent inhibitor of aflatoxin B₁ hepatocarcinogenesis in rainbow trout.¹³

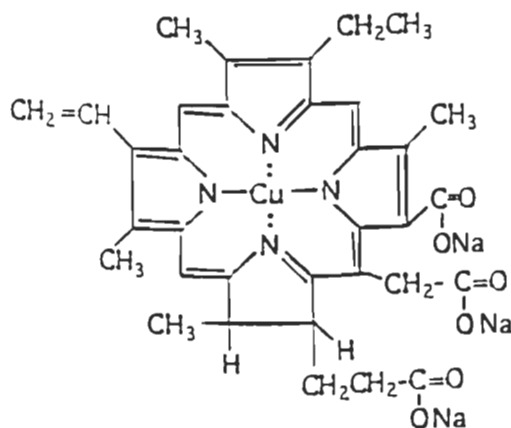
It has been suggested that the antimutagenic activity of chlorophyllin comes from its strong complexation with parent mutagens or their intermediates, scavenging of free radicals and active oxygen species, and suppression or interference with metabolic activation by

specific cytochrome (P-450) and other metabolizing enzymes.¹⁴⁻¹⁷ Chlorophyllin was also shown *in vivo* to efficiently inhibit precarcinogenic target organ DNA adduction by aflatoxin B₁ in trout¹⁶ and 2-amino-3-methylimidazol [4,5-f]quinoline in rat.¹⁸ Since the major target of these anticancer drugs can involve DNA or DNA adducts, the interaction of chlorophyllin with DNA has major biological importance and thus, the present study is designed to investigate DNA-CHLN complexation *in vitro* and to provide structural information regarding the drug binding mode, sequence preference and DNA secondary structure, using infrared spectroscopy. Our structural information provides, to our knowledge, the first spectroscopic evidence regarding DNA-CHLN interaction and should help to elucidate the nature of this biologically important complex formation.

Recently, we have reported¹⁹ the interaction of chlorophyll *a* with calf-thymus DNA, in which CHL binding was mainly through the backbone PO₂ group (external binding) *via* chlorophyll Mg cation with minor interaction with the guanine and adenine N-7 atoms (groove binding). The CHL interaction resulted in a minor helix opening and a partial reduction of B-DNA structure in favor of A-DNA.¹⁹ Vibrational spectroscopy has been widely used to analyse the nature of DNA-drug complexation and to provide structural information at molecular level.²⁰ Recently, we used vibrational spectroscopy (infrared and Raman) for the structural characterization of DNA-DES (DES=diethylstilbestrol), DNA-aspirin, DNA-vitamin C and DNA-carbohydrate²¹⁻²⁴ as well as DNA-cation^{25,26} and

protein complexes.²⁷ We believe that FTIR difference spectroscopy can be also applied here, in order to characterize the nature of the DNA-pigment interaction and to provide structural information on the DNA-CHLN complexes formed in aqueous solution.

In this work, FTIR difference spectroscopy is applied to study the interaction between calf-thymus DNA and chlorophyllin in aqueous solution at physiological pH, with CHLN/DNA(P) molar ratios of 1/80 to 1/2. Spectroscopic evidence regarding the pigment binding mode, binding constant, sequence selectivity and biopolymer secondary structure is provided. Furthermore, comparisons were made between the DNA-chlorophyllin and DNA-chlorophyll complexes and those of the corresponding metalloporphyrin-DNA adducts and the results are reported here.



Chlorophylline

Structure 2.1

2.3 Materials and methods:

2.3.1 Materials:

The crystalline chlorophyllin (copper-trisodium salt) was from Sigma Chemical Co., and used as supplied. Highly polymerized type I calf-thymus DNA sodium salt (7% Na content) was purchased from Sigma Chemical Co., and deproteinated by the addition of CHCl_3 and isoamyl alcohol in NaCl solution. Other chemicals were of reagent grade and used without further purification.

2.3.2 Preparation of Stock Solutions:

Sodium-DNA was dissolved to 2% w/w (0.05 M DNA(phosphate)) in 0.05 M NaCl and 1 mM sodium cacodylate (pH 7.30) at 5 °C for 24 h with occasional stirring to ensure the formation of a homogeneous solution. The appropriate amount of chlorophyllin (3 to 12 mM) was prepared in distilled water and added dropwise to DNA solution to attain desired CHLN/DNA(P) molar ratios of 1/80, 1/40, 1/20, 1/10, 1/4 and 1/2 at a final DNA concentration of 1% w/w or 0.025M DNA(phosphate). The solution pH was adjusted to 7.30-6.80, using NaOH solution. The infrared spectra were recorded 3h after mixing of CHLN and DNA solutions. The infrared spectra of DNA-CHLN complexes with $r > 1/2$ could not be recorded in solution due to solid gel formation.

2.3.3 Physical Measurements:

The infrared spectra were recorded on a Bomem DA3-0.02 FTIR spectrometer equipped with a nitrogen cooled HgCdTe detector and KBr beam splitter. The solution spectra were taken using AgBr windows with resolution of 2 to 4 cm^{-1} and 100-500 scans. The sample preparation and spectral measurements were carried out under green light (to avoid photodegradation of chlorophyllin in CHLN-DNA complexes). The water subtraction was carried out as in our previous report.^{21,22} A good water subtraction is achieved as shown by a flat baseline around 2200 cm^{-1} , where the water combination mode²⁸ is located (this portion of spectra is not shown). The difference spectra [(DNA solution + CHLN solution) - (DNA solution)] were produced, using a sharp DNA band at 968 cm^{-1} as internal reference. This band, due to deoxyribose C-C stretching vibrations, exhibits no spectral changes (shifting or intensity variations) on CHLN-DNA complexation and it was cancelled upon spectral subtraction. The intensity ratios of several DNA in-plane vibrations, related to A-T and G-C base pairs and the PO₂ stretching modes were measured (with respect to the reference band at 968 cm^{-1}), as a function of CHLN concentration with error of $\pm 3\%$. These intensity ratio measurements are used to quantify the amounts of CHLN bindings to the backbone PO₂ group and DNA bases. The detailed infrared spectral manipulations and intensity ratio calculations are presented in our recent publications.²¹⁻²⁶

2.4 Results and discussion:

2.4.1 DNA-CHLN complexes:

At low chlorophyllin concentration ($r=1/80$), the CHLN binds *via* intercalative mode into the G-C and A-T regions. Evidence for this comes from the minor increase in the intensity (5%) of the mainly G band at 1717 cm^{-1} and T band at 1663 cm^{-1} ²⁸⁻³³ (Fig. 2.2). These intensity changes were associated also with the shift of the bands at 1717 (mainly G) to 1715 and 1663 (mainly T) to 1666 cm^{-1} . Similarly, the mainly adenine band at 1609 shifted towards a lower frequency at 1605 cm^{-1} (spectrum is not shown). A minor intensity increase (5%) was also observed for the backbone PO_2 antisymmetric stretching vibration at 1222 cm^{-1} upon CHLN complexation (Fig. 2.2). The spectral changes observed for the phosphate band at 1222 cm^{-1} are also due to some degree of Cu-PO_2 interaction (outside binding). The positive difference features observed at 1710 , 1660 and 1214 cm^{-1} , in the difference spectra of CHLN-DNA complexes, are due to the increase in the intensity of the bands at 1717 , 1663 and 1222 cm^{-1} , while the presence of a weak negative derivative feature at 1600 cm^{-1} is due to the loss of intensity of the mainly adenine band at 1609 cm^{-1} upon drug interaction (Fig. 2.1, $r=1/80$).

The calculation of the binding constants was carried out as reported for other pigment complexes with DNA, RNA and mononucleotides.³⁴⁻³⁸ By assuming that there is only one type of interaction (intercalation) between CHLN and DNA molecule, the following equations can be established.



$$K = \frac{[\text{DNA: CHLN}]}{[\text{DNA}] [\text{CHLN}]} \quad (\text{Eq. 2})$$

Since chlorophyllin intercalation is limited to the G-C and A-T bases, the relative intensity variations of the bands at 1717 cm^{-1} (mainly G), at 1663 cm^{-1} (mainly T) were calculated at each drug concentration. The calculated intensities were used as a function of pigment concentration to estimate the $K(\text{G})$ for guanine and $K(\text{T})$ for thymine bases. The double reciprocal plot of $1/(I-I_0)$ vs. $1/[\text{CHLN}]$ is linear and the binding constant (K) can be estimated from the ratio of the intercept to the slope. I_0 is the initial relative intensity of the specific DNA absorption band and I is the relative intensity at different CHLN concentrations. The overall binding constant (K) for CHLN-DNA complexes is estimated to

be $3.56 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$. Similar methods, based on the intensity ratio variations of the Raman and infrared vibrational frequencies have been used to determine the binding constants of diethylstilbestrol (intercalating drug) ³⁸ and chlorophyll ¹⁹ to polynucleotides and the CH_3Hg^+ cation to mononucleotides. ³⁷

The value of $K=3.56 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ estimated for the DNA-CHLN complexes is consistent with the chlorophyllin being a weak DNA-intercalator. The association constants of the CHLN-DNA complexes are smaller than those of the strong DNA intercalators, such as ethidium bromide, acridine orange, methylene blue and other pigments with binding constants ranging from 10^5 M^{-1} to 10^6 M^{-1} . ³⁹⁻⁵⁰

The drug distributions around A-T and G-C base pairs (based on the binding constant $K= 3.56 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ and pigment concentration $6.5 \times 10^{-3} \text{ M}$), were 20% with the A-T bases and 15% around the G-C and less than 10% of CHLN were PO_2 bound (Fig. 2.3).

It is also important to note that a recent X-ray crystallographic study showed that the CuTMPyP4 [copper(II)*meso*-tetra(N-methyl-4-pyridyl)porphyrin] is hemiintercalated into the G-C-rich region of a hexamer duplex $[\text{d}(\text{CGATCG})]_2$ with a major electrostatic interaction between positively charged nitrogen atoms of the pyridyl rings and negatively

charged backbone phosphate oxygen atom.⁵⁰ However, the chlorophyllin structure is rather different from that of the copper-porphyrin complex intercalated into the G-C region. Similarly, the calf-thymus DNA with major A-T base pairs (60%) and less G-C content (40%) is different from that of the hexamer [d(CGATCG)]₂ oligonucleotide. The observed structural dissimilarities between copper porphyrin and CHLN on one hand, and the oligonucleotide hexamer with calf-thymus DNA on the other hand, are the main reasons for the different binding modes of the CHLN and copper-porphyrin in these DNA complexes.

At $1/80 < r < 1/20$, a minor decrease in the intensity (5 to 10%) of the bands at 1717, 1663 and 1222 cm^{-1} was observed upon drug interaction (Fig. 2.2). The observed spectral changes were associated with the loss of the intensity and shifting of the B-DNA indicator³³ at 838 to 833 cm^{-1} (deoxyribose-phosphate mode) in the spectra of the CHLN-DNA complexes. The shift of the B-DNA indicator from 838 to 833 cm^{-1} was accompanied by the shift of the other B-DNA marker band at 1717 to 1712 cm^{-1} .³³ The observed spectral changes are related to a partial reduction of B-DNA structure towards A-DNA. Similar behaviors were observed in the infrared spectra of the chlorophyll-DNA complexes, where a partial reduction of the B-DNA structure occurred in favor of A-DNA conformation.¹⁹

At $r > 1/20$, a minor helix destabilization occurred upon drug complexation. Evidence for this comes from an increase in the intensity (10-15%) of the bands at 1717, 1663, 1609 and 1222 cm^{-1} (Fig. 2.1, $r = 1/10$). The presence of several positive derivative features at 1710, 1651 and 1227 cm^{-1} in the difference spectra of CHLN-DNA complexes are also consistent with the intensity increase of DNA in-plane vibrations (Fig. 2.1, $r = 1/10$). The intercalation of the porphyrin and copper-porphyrin CuTMPyP4 complexes also resulted in a minor helix destabilization of DNA oligonucleotide.^{41,50} Similarly, the melting of DNA double helix by thermal denaturation or by cation coordination also resulted in a major increase in the intensity of several DNA vibrational frequencies.^{20, 25, 26}

At high pigment concentrations ($r = 1/4$ and $1/2$), the major intensity variations observed for the A-T vibrations were combined with considerable shiftings of the bands at 1663 (T) to 1668 cm^{-1} and 1609 (A) to 1598 cm^{-1} upon drug intercalation (Figs 2.1 and 2.2, $r = 1/4$, and $1/2$). The observed spectral changes are indicative of further drug interaction with the A-T-rich regions.

Additional evidence for CHLN-DNA complexation is also coming from the major spectral changes of the chlorophyllin vibrational frequencies upon DNA interaction. A strong vibration at 1575 cm^{-1} in the spectrum of the free pigment, related to the porphyrin ring C=C and C=N stretching modes⁴⁴ shifted towards a lower frequency at 1564 cm^{-1} ,

upon drug interaction (Fig. 2.1). Similarly, the band at 1403 cm^{-1} due to the ring C-N and C-O stretching vibrations⁴⁴ appeared at 1400 cm^{-1} , in the spectra of CHLN-DNA complexes (Fig. 2.1). The observed spectral shiftings are due to major structural changes of the porphyrin rings upon DNA interaction. It should be noted that the strong positive derivative features observed at 1636 , 1560 and 1403 cm^{-1} in the difference spectra of CHLN-DNA complexes formed at high drug content are coming from the chlorophyllin vibrations and they are not related to DNA molecule (Fig. 2.1, $r=1/2$).

The overall spectral changes observed are due to a major drug intercalation *via* A-T and G-C base pairs and stabilization of these complexes by some degree of drug-PO₂ interaction. Similar spectral changes were observed in the Raman spectra of other copper-porphyrin complexes intercalated into the G-C and A-T-rich regions of the native and synthetic DNAs.³⁹⁻⁴⁰

2.4.2 Comparisons between CHLN-DNA and CHL-DNA complexes:

Porphyrins and their metal derivatives intercalate in both native and synthetic DNAs.⁴¹⁻⁵⁰ Porphyrins also bind DNA *via* outside (nonintercalative mode) binding.⁴² The mode of binding is controlled by porphyrin shape and charge. Porphyrins with axial ligands at fifth and sixth coordination sites of cation sterically block intercalation. Therefore,

free porphyrin H_2TMPyP_4 and four-coordinate metal derivatives such as $NiTPMyP_4$, $CuTPMyP_4$ and $PdTPMyP_4$ intercalate, whereas five- or six-coordinate $MnTMPyP_4$, $FeTMPyP_4$, $CoTMPyP_4$ and $ZnTMPyP_4$ bind *via* non-intercalative modes.^{45,46}

Chlorophyllin with four-coordinate copper cation in the center is a good candidate for DNA intercalation, while chlorophyll with five- or six-coordinate magnesium ion (in aqueous solution) binds DNA *via* nonintercalative mode.¹⁹ On the basis of the infrared spectroscopic results presented here for the first time, it is clearly evident that chlorophyllin binds calf-thymus DNA *via* intercalative mode into the G-C and A-T-rich regions with minor pigment- PO_2 interaction (outside binding). At high pigment content, minor helix destabilization occurs with a partial reduction of the B-DNA structure in favor of A-DNA. On the other hand, chlorophyll binding with calf-thymus DNA was mainly through Mg- PO_2 interaction (outside binding) with minor Mg-N-7 coordination (groove binding).¹⁹ Chlorophyll complexation resulted also in a major reduction of B-DNA structure in favor of A-DNA with a partial helix opening at high pigment content.¹⁹ The calculated binding constants are $K = 1.13 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ for CHL-DNA and $3.56 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ for CHLN-DNA adducts. The differences in the stability of these pigment-DNA complexes can be attributed to a stronger interaction of Mg- PO_2 (external binding) in the CHL-DNA and a weak intercalative mode of the chlorophyllin in the CHLN-DNA complexes. The larger size of the

chlorophyllin (with respect to chlorophyll) plays an important role in the formation of less stable metalloporphyrin-DNA complexes.

2.5 Acknowledgements:

This work is supported by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC).

2.6 References:

- (1) Doll, R. Proc. Nutr. Soc. **1990**, 49, 119-131.
- (2) Doll, R. ; Peto, R. J. Natl. Cancer Inst. **1981**, 66, 1191-1308.
- (3) Farber, E. Am. J. Pathol. **1982**, 106, 271-296.
- (4) Wattenberg, L.W. Proc. Am. Assoc. Cancer Res. **1990**, 32, 461-463.
- (5) Hayatus, H.;Arimoto, S.; Negishi, T. Mutat. Res. **1988**, 202, 429-446.
- (6) Dragsted, L. O.; Strube, M.;Larsen, J. C. Pharmacol. Toxicol. **1993**, 72, 116-135.
- (7) Lai, C.; Butler, M. A. ; Matney, T. S. Mutat. Res. **1980**, 77, 245-250.
- (8) Kimm, S.; Tchaj, B.; Park, S. ; Kang, S. Korean J. Biochem. **1982**, 14, 1-7.
- (9) Kimm, S. ; Park, S. Korean J. Biochem. **1982**, 14, 47-59.

- (10) Ong, T.; Whong, W.; Stewart, J. ; Brockman, H. E. *Mutat. Res.* **1986**, 173, 11-115.
- (11) Harrison, J. W. E.; Levin, S. E. ; Trabin, B. J. *Am. Pharm. Assoc.* **1954**, 43, 722-737.
- (12) Young, R.W. ; Beregi, J. S. *J. Am. Geriatr. Soc.* **1980**, 28, 48-50.
- (13) Breinholt, V.; Hendricks, J.; Pereira, C.; Arbogast, D. ; Bailey,G. *Cancer Res.* **1995** , 55, 57-62.
- (14) Newmark, H. L. A. *Nutr. Cancer* **1984**, 6, 58-70.
- (15) Arimoto, S.; Negishi, T. ; Hayatsu, H. *Cancer Lett.* **1980**, 11, 29-33.
- (16) Dashwood, R. H.; Breinholt, V. ; Bailey, G. *Carcinogenesis (Lond.)* **1991**, 12, 939-942.
- (17) Romert, L.; Curvall. M. ; Jenssen, D. *Mutagenesis* **1992**, 7, 349-355.
- (18) Dashwood, R. H. *Carcinogenesis (Lond.)* **1992**, 13, 113-118.
- (19) Neault, J. F. ; Tajmir-Riahi, H. A. *FEBS Lett.* **1997** submitted for publication.
- (20) Spiro, T. G. *Biological Applications of Raman Spectroscopy*; Wiley: New York 1987, pp 81-133.
- (21) Neault, J. F. ; Tajmir-Riahi, H. A. *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 8140-8143.
- (22) Neault, J. F.; Naoui, M.; Manfait, M. ; Tajmir-Riahi, H. A. *FEBS Lett.* **1996**, 382, 26-30.
- (23) Neault, J. F.; Naoui, M. ; Tajmir-Riahi, H. A. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1995**, 13, 387-397.

- (24) Tajmir-Riahi, H. A.; Naoui, M.; Diamantoglou, S. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1994**, 12, 217-234.
- (25) Tajmir-Riahi, H. A. ; Neault, J. F.; Naoui, M. *FEBS Lett.* **1995** 370, 105-108.
- (26) Tajmir-Riahi, H.A.; Ahmad, R.; Naoui, M. ; Diamantoglou, S. *Biopolymers* **1995**, 35, 493-501.
- (27) Ahmed, A.; Tajmir-Riahi, H. A. ; Carpentier, R. *FEBS Lett.* **1995**, 363, 65-68.
- (28) Alex, S. ; Dupuis, P. *Inorg. Chim. Acta* **1989**, 157, 271-281.
- (29) Keller, P. B. ; Hartman, K. A. (1986) *Nucleic Acids Res.* **1986**, 14, 8167-8182.
- (30) Tsuboi, M. *Appl. Spectrosc. Rev.* **1969**, 3, 45-90.
- (31) Loprete, D. M. ; Hartman, K. A. *Biochemistry* **1993**, 32, 4077-4082.
- (32) Starikov, E. B.; Semenov, M. A.; Maleev, V. Ya ; Gasan, A. I. *Biopolymers* **1991**, 31, 255-273.
- (33) Brahms, S.; Brahms, J. ; Pilet, J. *Isr. J. Chem.* **1974**, 12, 153-163.
- (34) Muller, W.; Crothers, D. M. *Eur. J. Biochem.* **1975**, 54, 267-277.
- (35) Tuite, E. ; Kelly, J. M. *Biopolymers* **1995**, 35, 419-433.
- (36) Tuite, E. ; Norden, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 7548-7556.
- (37) Tajmir-Riahi, H. A.; Langlais, M. ; Savoie, R. *Biochim. Biophys. Acta* **1988**, 956, 211-216.
- (38) Neault, J. F. ; Tajmir-Riahi, H. A. *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 8901-8904.
- (39) Wheeler, G. V.; Chinsky, L.; Miskovsky, P. ; Turpin, P. Y. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1995**, 13, 399-412.

- (40) Kruglik, S. G.; Galievsky, V. A.; Chirvony, V. S.; Apanasevich, P. A.; Ermolenkov, V. V.; Orlovich, V. A.; Chinsky, L.; Turpin, P. Y. J. Phys. Chem. **1995**, **99**, 5732-5741.
- (41) Fiel, R. J.; Howard, J. C.; Mark, E. H. ; Datta Gupta, N. Nucleic Acids Res. **1979**, **6**, 3093-3118.
- (42) Carvlin, M. J. ; Fiel, R. J. Nucleic Acids Res. **1983**, **11**, 6121-6139.
- (43) Sari, M. A.; Battioni, J. P.; Dupre, D.; Mansuy, D.; Le Pecq, J. B. Biochemistry **1990**, **29**, 4205-4215.
- (44) Strahan, G. D.; Lu, D.; Tsuboi, M.; Nakamoto, K. J. Phys. Chem. **1992**, **96**, 6450-6456.
- (45) Pasternak, R. F.; Gibbs, E.J.; Villafranca, J.J. Biochemistry **1983**, **22**, 2406-2414.
- (46) Marzilli, L. G.; Banville, D. L.; Zon, G. ; Wilson, W. D. (1986) J. Am. Chem. Soc. **1986**, **108**, 4188-4192.
- (47) Kelly, J. M.; Murphy, M. J.; McConnell, D. J. ; Oh Ugin, C. Nucleic Acids Res. **1985**, **13**, 167-184.
- (48) Hudson, P. B.; Sou, J.; Berger, D. J. ; McMillin, D. R. J. Am. Chem. Soc. **1992**, **114**, 8997-9002.
- (49) Brun, A. M. ; Harriman, A. J. Am. Chem. Soc. **1994**, **116**, 10383-10393.
- (50) Lipscomb, L. A.; Zhou, F. X.; Presnell, S. R.; Woo, R. J.; Peek, M. F.; Plaskon, R. R. ; Williams, L. D. Biochemistry **1996**, **35**, 2818-2823.

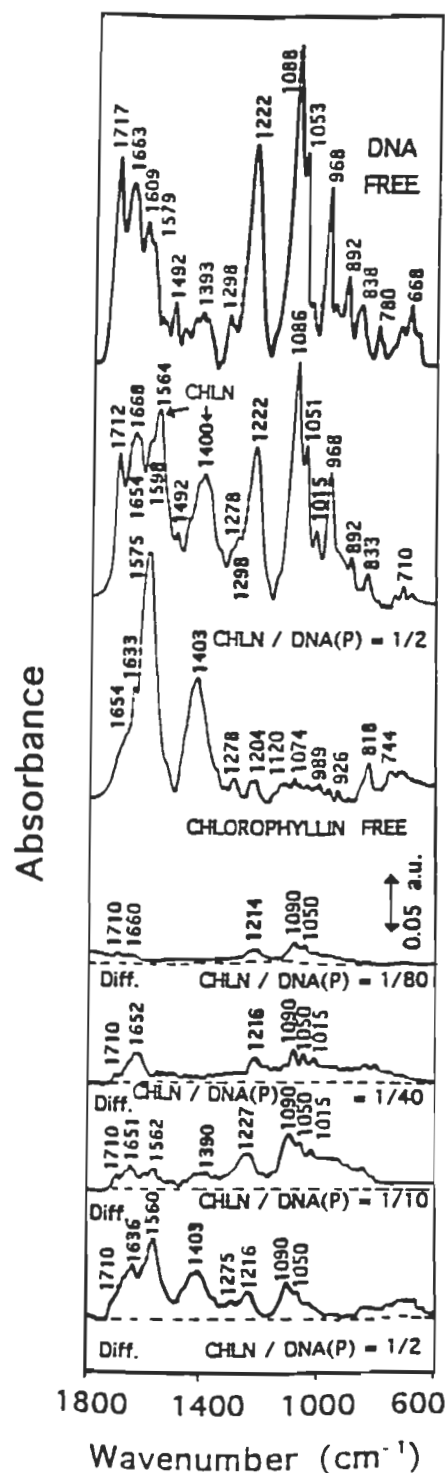


Figure 2.1 FTIR spectra (top three curves) and difference spectra [(DNA solution + CHLN solution) - (DNA solution)] (bottom four curves) of the uncomplexed calf-thymus DNA and its chlorophyllin (CHLN) adducts in aqueous solution at pH = 6.80-7.30 with different CHLN/DNA (P) molar ratios in the region 1800-600 cm^{-1} (the baseline are shown as broken lines).

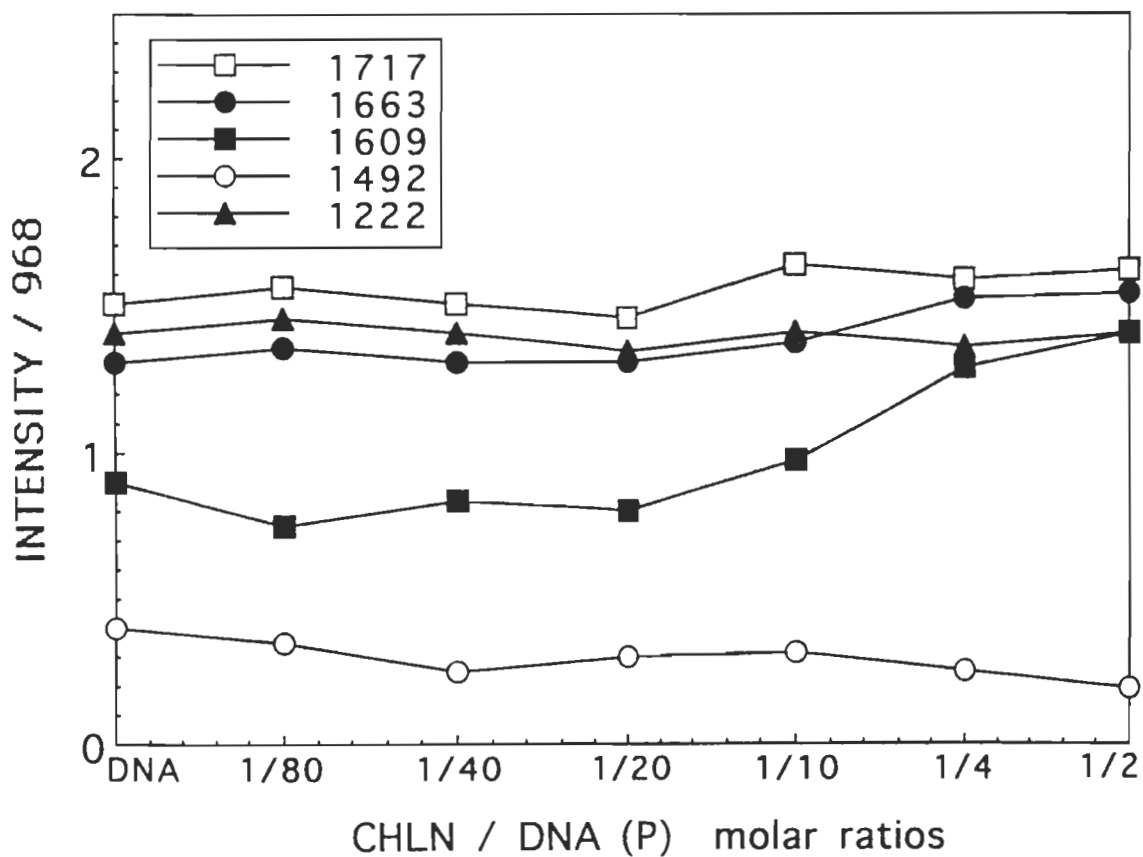


Figure 2.2 Intensity ratio variations (with respect to the the reference band at 968 cm^{-1}) for several DNA in-plane vibrations at 1717 (G,T), 1663 (T,G,A,C), 1609 (A), 1492 (C,G) and 1222 cm^{-1} (PO_2 stretch) as a function of chlorophyllin (CHLN) concentration (different CHLN/DNA(P) molar ratios).

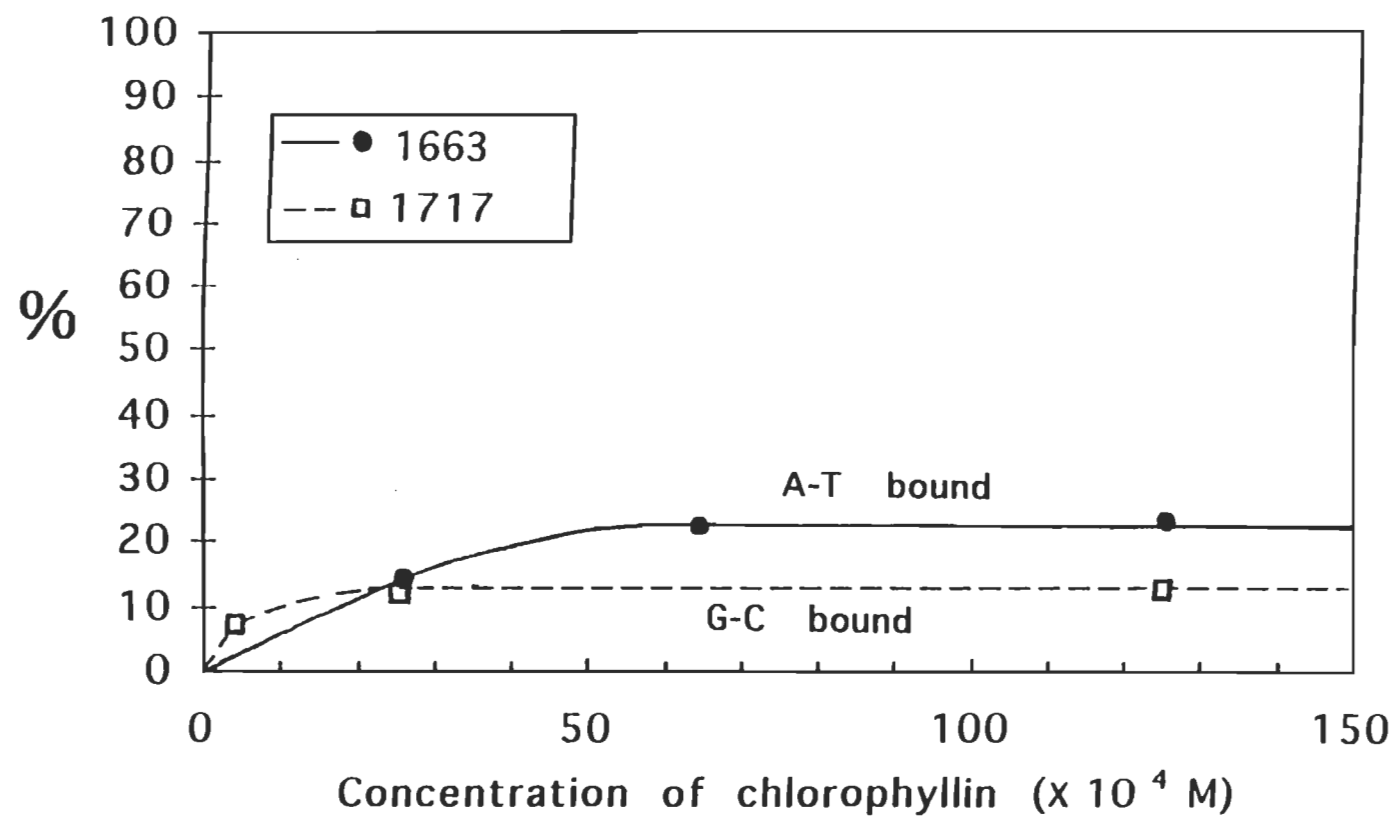


Figure 2.3 Calculated distributions of the CHLN bound to the A-T (1663 cm⁻¹, mainly thymine) and to the G-C (1717 cm⁻¹, mainly guanine) regions in aqueous solution with DNA concentration of 0.025 M (phosphate) as a function of CHLN concentration (M) based on the $K = 3.56 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ at a pigment concentration of $6.5 \times 10^{-3} \text{ M}$.

CHAPITRE 3

RNA-Diethylstilbestrol Interaction Studied by Fourier Transform Infrared Difference Spectroscopy.

Publié dans la revue

The Journal of Biological Chemistry

1997, 272, 8901-8904.

Soumis sous forme révisée le 14 janvier 1997

Publié le 4 avril 1997

RNA-Diethylstilbestrol Interaction Studied by FTIR Difference Spectroscopy

J. F. Neault and H. A. Tajmir-Riahi*

Department of Chemistry-Biology, University of Québec at Trois-Rivières, C.P. 500
TR(Québec) Canada G9A 5H7

Keywords: RNA; DNA; DES; drug; binding mode; conformation; FTIR spectroscopy

Abbreviations used are: DES, Diethylstilbestrol; DESQ, Diethylstilbestrol-4', 4''-quinone; FTIR, Fourier transform infrared; A, adenine; C, cytosine; G, guanine; T, Thymine; U, uridine; r, DES/RNA(phosphate) molar ratio.

***Corresponding author:** Fax: 819-376-5057; Tel: 819-376-5077 (ext. 3321); E-mail: Tajmirri@uqtr.quebec.ca

3.1 Abstract:

Diethylstilbestrol (DES), a synthetic estrogen, is known to be carcinogen in human and in animals. This study was designed to examine the interaction of DES with yeast RNA in aqueous solution at physiological pH with drug/RNA(P) (P=phosphate) molar ratios of 1/80, 1/40, 1/20, 1/10, 1/4 and 1/2. Fourier transform infrared (FTIR) difference spectroscopy was used to determine the drug binding mode, the binding constant, the sequence selectivity and RNA secondary structure in the RNA-DES complexes.

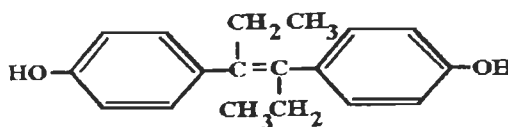
Spectroscopic evidence showed that at low drug concentration (1/80 and 1/40), DES is intercalating through both G-C and A-U base pairs with minor interaction with the backbone PO₂ group (external binding). The calculated binding constant of $K \sim 8.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ at a drug concentration of $3.12 \times 10^{-4} \text{ M}$ shows that DES is a weaker intercalator than those of the methylene blue, acridine orange and ethidium bromide. At high drug content ($r > 1/40$), a partial helix destabilization occurs with no alteration of RNA conformation upon drug complexation. However, a comparison with DNA-DES complexes showed that drug intercalation causes major reduction of the B-DNA structure in favor of A-DNA with no participation of the backbone PO₂ group in the DES-DNA complexation.

3.2 Introduction:

DES (Structure 1), a synthetic estrogen, is known to be carcinogen both in human and in animals (1,2). It was used world wide from 1940's until 1970's to prevent miscarriages in women, while in the same time it was found to cause cancer in experimental animals. Although DES application has been banned for pregnancy, it remains in use for other clinical purposes such as estrogen replacement therapy for hormone deficiency. The DES induced carcinogenesis has been considered to be due to the high hormonal potency of this synthetic estrogen and possible DES-DNA adduct formation *in vivo* (3). Radioactively labeled DES was found to bind DNA *in vivo* (3,4,5) and *in vitro* (6) but the nature of complexation with nucleic acids could not be clarified in these investigations. The major problem in defining the nature of drug-DNA interaction was mainly related to the instability of DNA-DES and DNA-DESQ complexes (DESQ= diethylstilbestrol-4',4"-quinone, a metabolic intermediate product derived from DES oxidation) formed *in vivo* and *in vitro* (6,7). Similarly, the possibility of DNA intercalate formation with both DES and DESQ was not included (7,8). It has also been suggested that DES-DNA adduct formation may occur under oxidative stress (9,10). However, a number of biological and biochemical effects of DES were noted which depended on metabolic activation of stilben and are commonly associated with genotoxic activity (11). Since the DES induced carcinogenesis is related to its complexation with nucleic acids (2), the structural analysis of DES complexes with DNA and RNA and their constituents has major biological importance. Our recent structural characterization of DES-DNA complexes showed that DES is a weak intercalator with

affinity towards A-T-rich region (12). However, at high drug concentration, a partial helix opening occurs with major reduction of B-DNA structure in favor of A-DNA (12). The present study is also designed to investigate the interaction between RNA and DES *in vitro* and to establish correlations between spectral changes and drug binding mode, sequence selectivity, RNA stability and conformation, using FTIR difference spectroscopy. In recent years, we have used vibrational spectroscopy (infrared and Raman) for the structural characterization of several DNA-drug (12,13,14); DNA-carbohydrate (15), DNA-cation (16,17) and protein complexes (18). We believe FTIR spectroscopy can also be used here to obtain structural information, regarding the nature of DES-RNA interaction and the effect of drug complexation on the biopolymer secondary structure in aqueous solution.

In this work, FTIR difference spectroscopy is applied to study the interaction between yeast RNA and DES in water-ethanol solution at physiological pH, with drug/RNA(P) molar ratios of 1/80 to 1/2. Evidence for the drug binding mode, sequence preference, RNA secondary structure and helix stability is provided. Furthermore, comparisons were made with those of the corresponding DNA-DES complexes and the results are reported here.



Diethylstilbestrol
Structure 3.1

3.3 Materials and methods:

Yeast RNA sodium salt was purchased from Sigma Chemical Co., and used as supplied. DES was from Sigma Chemical Co., and recrystallized from ethanol-water mixture. Other chemicals were reagent grade and used without further purification.

3.3.1 Preparation of Stock Solution:

Sodium-RNA (15% t-RNA, 5% m-RNA and 80% r-RNA) was dissolved to 2% (w/w, 0.05 M phosphate) in 0.05 M NaCl and 1 mM sodium cacodylate solution (pH 7.30) at 5 °C with occasional stirring. Solution of DES 0.3 to 12 mM was also prepared in ethanol (DES is not soluble in water). Mixtures of drug and RNA were prepared by adding DES solution dropwise to RNA solution with constant stirring to give the desired drug/RNA molar ratios of 1/80, 1/40, 1/20, 1/10, 1/4 and 1/2 at a final RNA concentration of 1% w/w or 0.025 M RNA (phosphate). Solution pH was 7.30-6.80 and the infrared spectra were recorded 4 h after initial mixing of drug and RNA solution. The infrared spectra of DES-RNA complexes with $r > 1/2$ could not be recorded in solution due to precipitation.

Infrared spectra were recorded on a BOMEM DA3-0.02 Fourier transform infrared spectrometer equipped with nitrogen cooled HgCdTe detector and a KBr beam splitter. The solution spectra were taken on AgBr windows with spectral resolution of 2 to 4 cm^{-1} and

100 to 500 scans. Water subtraction was carried out as in our previous report (16). A good water subtraction was achieved by a flat baseline around 2200 cm^{-1} , where the H_2O combination mode is located(19). The difference spectra [(RNA solution + DES solution) - (RNA solution)] were produced, using the RNA band at 913 cm^{-1} as internal reference. This band, due to ribose-phosphate vibration exhibits no spectral changes (intensity or shifting) upon drug complexation and it is cancelled on spectral subtraction. The difference spectra contain several positive and negative derivative features in the region of $1800\text{-}600\text{ cm}^{-1}$, whose amplitudes are less than 20% of the original peaks, with an estimated error of $\pm 5\%$ (absorbance). Several positive features in the difference spectra of DES-RNA complexes are coming from DES vibrations and are not due to RNA vibrational mode (properly labeled).

The intensity ratios of several RNA in-plane vibrations related to A-U, G-C and the backbone PO_2 groups were measured as a function of drug concentration with error of $\pm 5\%$. These intensity ratio variations were used to measure quantitatively the amounts of drug-base and drug- PO_2 bindings. The detailed intensity ratio measurements and spectral manipulations are described in our previous publications (16).

The calculation of the binding constant was also carried out as reported for other drug complexes with DNA, RNA and mononucleotides (20-23). By assuming that there is only

one type of interaction (intercalation) between drug and RNA molecule, the following equations can be established.



$$K = \frac{[\text{RNA:DES}]}{[\text{RNA}] [\text{DES}]}$$

The relative intensities for the band at 1698 cm^{-1} (mainly G), at 1608 cm^{-1} (mainly A) and at 1244 cm^{-1} (backbone PO_2) were calculated for each drug concentration. The calculated intensities were used as a function of drug concentration to estimate the $K(\text{G})$ for guanine, $K(\text{A})$ for adenine and $K(\text{PO}_2)$ for the phosphate group. The overall association constant (K) estimated for the above equation was $8.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ at DES concentration of $3.12 \times 10^{-4} \text{ M}$.

3.4 Results and discussion:

3.4.1 RNA-DES Complexes:

At low drug concentration ($r=1/80$ and $1/40$), DES intercalates in the G-C and A-U-rich regions. Evidence for this comes from minor intensity increase (10%) of the RNA in-plane vibrations at 1698 cm^{-1} (G,U) and 1654 cm^{-1} (U,G, A,C) (24-29). The increase in the intensity was associated also with the shift of the band at 1698 cm^{-1} towards a lower

frequency at 1695 cm^{-1} , while the band at 1654 cm^{-1} exhibited no shifting upon DES complexation (Figs 3.1 and 3.2). Similarly, the mainly adenine band at 1608 cm^{-1} (19) gained intensity (20%) on drug interaction (Fig. 3.2). The positive derivative features at $1690\text{--}1689\text{ cm}^{-1}$ (G,U), $1656\text{--}1650\text{ cm}^{-1}$ (U,G,A,C), $1610\text{--}1608\text{ cm}^{-1}$ (A) and $1250\text{--}1245\text{ cm}^{-1}$ (PO₂) in the difference spectra of DES-RNA complexes are arising from the increase in the intensity of the RNA bands at 1698 , 1654 , 1608 and 1244 cm^{-1} (Figs 3.1 and 3.2 $r=1/80$ and $1/40$). The observed spectral changes are related to drug intercalation with both G-C and A-U base pairs. However, at this stage, the drug intercalation with the G-C bases is larger than that of the A-U rich region. The calculated binding constant $K \sim 8.5 \times 10^4\text{ M}^{-1}$ obtained at a drug concentration of $3.12 \times 10^{-4}\text{ M}$ is indicative of DES being a weak intercalator. The distributions of drug around DNA bases were about 35% with the G-C and 25% with A-U base pairs (Fig. 3.3). The RNA backbone PO₂ antisymmetric band at 1244 cm^{-1} (24,26) also gained intensity (10%) upon drug complexation (Fig. 3.2). This is indicative of some degree of DES-PO₂ interaction (external binding) in these DES-RNA complexes. However, the amount of drug-phosphate binding is less than 20% (Fig. 3.3). Similar increase in the intensity of DNA in-plane vibrations were observed in the Raman spectra of several porphyrins and their metal derivatives, intercalated in the A-T or G-C-rich regions of the synthetic and native DNAs (30,31). DES intercalation with DNA resulted also in major spectral changes (intensity increase and shifting) of several DNA in-plane vibrations, related to the A-T and G-C base pairs (12). The possibility of the external binding with the A-T, G-C or PO₂ donor groups have been also examined for several DNA

intercalators (31-34). The band at 1488 cm^{-1} related mainly to the cytosine vibrations (24) exhibited no major intensity variations or shifting upon DES interaction (Fig. 3.2). This is indicative of less perturbation of cytosine bases in DES-RNA complex formation.

A comparison with the infrared spectra of other strong DNA and RNA intercalators such as ethidium bromide, acridine orange and methylene blue (recorded in our laboratory), showed that DES is a weaker intercalator than these pigments. The calculated binding constants for DNA-pigment and RNA-pigment complexes are ranging from 10^5 M^{-1} to 10^6 M^{-1} (21-23,35-38). These pigments are intercalated in both G-C, A-T or A-U-rich regions with no major sequence preference and with minor drug-phosphate interaction (external binding), similar to RNA-DES complexes investigated here.

At $r > 1/40$, DES interaction causes a partial helix destabilization. Evidence for this comes from major increase (20%) in the intensity of RNA bands at 1698, 1654, 1608 and 1244 cm^{-1} (Fig. 3.2, $r = 1/20$). Similar increase of intensity was observed for several DNA or RNA in-plane vibrations upon thermal denaturation and acid fixation (16,23). The partial helix opening increases the chance of drug binding (externally) to different RNA donor sites that are available on local helix melting. At $r > 1/20$, some decrease in the intensity (20-30%) of several RNA bands at 1698, 1654, 1488 and 1244 cm^{-1} are observed as results of minor perturbations of ribose-phosphate backbone geometry, upon drug complexation (Fig. 3.2,

$r=1/10$). Evidence for such structural changes comes from the shift of the infrared marker bands at 1698 (G,U) to 1689 cm^{-1} , 1244 (PO_2 stretch) to 1247 cm^{-1} and 861 (sugar-phosphate) to 870 cm^{-1} . However, since the infrared indicators at 810 and 870 cm^{-1} related to ribose in C3'-endo/anti conformation (25,39), exhibited no major shifting, the RNA remains in the A-family structure in these DES-RNA complexes (Fig. 3.1). No further drug-RNA interaction occurred at $r>1/10$, due to the lack of spectral changes (intensity or shifting) observed for RNA and drug vibrational frequencies (Fig. 3.2). No major differences are also observed between the difference spectra obtained for the DES-RNA complexes with $r=1/10$ and those of the corresponding drug-RNA complexes with $r=1/4$ and $1/2$ (Figs 3.1 and 3.2).

Additional evidence for DES-RNA interaction comes also from the major spectral shiftings of several DES vibrational frequencies (12). The shifts of the bands at 1612 cm^{-1} (DES C=C stretches) to 1610 cm^{-1} ; 1462 (DES C-O stretches) to 1460 cm^{-1} ; 1045 (DES C-C stretches) to 1040 cm^{-1} and 836 (DES ring vibrations) to 838 cm^{-1} are related to the DES-RNA interaction (Fig. 3.1). However, it should be noted that at low drug concentration, most of the DES infrared vibrations were masked by the strong RNA vibrations, while at high drug content, some of the RNA vibrations were overlapped by drug vibrational frequencies (Fig. 3.1). However, these overlappings did not interfere with conclusive interpretation of our infrared results regarding the RNA-DES complexes. The positive derivative features observed at 1610, 1513, 1460, 1372, 1250, 1038, 850 and 838

cm^{-1} in the difference spectra of the DES-RNA complexes are coming from DES vibrations and they are not related to the RNA molecule (Fig. 3.1 $r=1/10$).

3.4.2 Comparison between RNA-DES and DNA-DES complexes:

Recent spectroscopic results on the DES-DNA complexes showed that at low drug concentration, DES is a weak intercalator with major affinity towards A-T-rich region, whereas at high drug content DES binding extended to G-C base pairs with no drug-PO₂ interaction (12). At high DES content, a major helix destabilization was also observed with a partial reduction of B-DNA structure in favor of A-DNA (12). However, on the basis of the FTIR spectroscopic results on RNA-DES complexes presented here for the first time, it is clearly evident that at low drug concentration, DES intercalates in both A-U and G-C-rich regions of RNA with some degree of drug-PO₂ interaction (external binding). At high drug content, a partial helix opening occurs, while RNA remains in the A-family structure. The reason is mainly due to less flexibility of RNA structure (mainly A-conformation) (40) with respect to the polymorphic nature of DNA conformations, that readily adapt B, A, C, D and Z structures (41,42). The local helix melting provides additional binding sites for the DES-biopolymer interaction (groove binding) *via* G-C and A-U bases donor groups. A partial helix destabilization occurred for DNA at high DES content ($r>1/10$), while RNA local helix opening was observed at lower drug concentration ($r>1/40$). This can also be due to a complete DNA double helicity with respect to RNA structure, which contains a partial non-helical structure and to minor differences in some of the H-bonding arrangements (40,43).

3.5 Acknowledgements:

This work is supported by Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC).

3.6 References:

1. Herbst, A. L., Ulfelder, H., and Poskanzer, D. C. (1971) *New Eng. J. Med.* **28**, 878-881.
2. Kirkman, H. (1959) *Natl. Cancer Inst. Monogr.* **1**, 1-59.
3. Wiesburger, J. H., and Williams, G. M. (1984) *ACS Monogr.* **182**, 1323-1337.
4. Blackburn, G. M., Thompson, M. H., and King, H. W. S. (1976) *Biochem. J.* **158**, 643-646.
5. Metzler, M., and McLachlan, J. A. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **85**, 874-884.
6. Lutz, W. K., Jaggi, W., and Schlatter, C. (1982) *Chem. Biol. Interact.* **42**, 251-257.
7. Liehr, J. G., DaGue, B. B., and Ballatore, A. M. (1985) *Carcinogenesis (Lond.)* **6**, 829-836.
8. Ts'o, P. O. P., and Lu, P. (1964) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **51**, 17-24.
9. Bhat, H. K., Han, X., Gladek, A., and Liehr, J. G. (1994) *Carcinogenesis (Lond.)* **15**, 2137-2142.

10. Gladek, A., and Liehr, J. G. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 16847-16852.
11. Metzler, M. (1984) *Rev. Biochem. Toxicol.* **6**, 191-220.
12. Neault, J. F., and Tajmir-Riahi, H. A. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 8140-8143.
13. Neault, J. F., Naoui, M., Manfait, M., and Tajmir-Riahi, H. A. (1996) *FEBS Lett.* **382**, 26-30.
14. Neault, J. F., Naoui, M., and Tajmir-Riahi, H. A. (1995) *J. Biomol. Struct. Dyn.* **13**, 387-397.
15. Tajmir-Riahi, H. A., Naoui, M., and Diamantoglou, S. (1994) *J. Biomol Struct. Dyn.* **12**, 217-234.
16. Tajmir-Riahi, H. A., Neault, J. F., and Naoui, M. (1995) *FEBS Lett.* **370**, 105-108.
17. Tajmir-Riahi, H. A., Ahmad, R., Naoui, M., and Diamantoglou, S. (1995) *Biopolymers* **35**, 493-501.
18. Ahmed, A., Tajmir-Riahi, H. A., and Carpentier, R. (1995) *FEBS Lett.* **363**, 65-68.
19. Alex, S., and Dupuis, P. (1989) *Inorg. Chim. Acta* **157**, 171-181.
20. Tajmir-Riahi, H. A., Langlais, M., and Savoie, R. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* **956**, 211-216.
21. Muller, W., and Crothers, D. M. (1975) *Eur. J. Biochem.* **45**, 267-277.
22. Tuite, E., and Kelly, J. M. (1995) *Biopolymers* **35**, 419-433.
23. Tuite, E., and Norden, B. (1994) *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 7548- 7556.
24. Starikov, E. B., Semenov, M. A., Maleev, V. Ya., and Gasan, A. L. (1991) *Biopolymers* **31**, 255-273.

25. Loprete, D. M., and Hartman, K. A. (1993) *Biochemistry* **32**, 4077-4082.
26. Spiro, T. G. (ed.) (1987) *Biological Applications of Raman Spectroscopy*, Wiley & Son, New York, pp. 81-133.
27. Tsuboi, M. (1969) *Appl. Spectrosc. Rev.* **3**, 45-90.
28. Chen, M. C., and Thomas, Jr., G. J. (1974) *Biopolymers* **13**, 615-626.
29. Thomas, Jr., G. J., Chen, M. C., and Hartman, K. A. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* **324**, 37-49.
30. Wheeler, G. A., Chinsky, L., Miskovsky, P. and Turpin, P. Y. (1995) *J. Biomol. Struct. Dyn.* **13**, 399-412.
31. Kruglik, S. G., Galievsky, V. A., Chirvony, V. S., Apanasevich, P. A., Ermolenkov, V. V., Orlovich, V. A., Chinsky, L., and Turpin, P. Y. (1995) *J. Phys. Chem.* **99**, 5732-5741.
32. Weiner, P. K., Langridge, R., Blaney, J. M., Schaefer, R., and Kollman, P. A. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 3754-3758.
33. Brun, A. M., and Harriman, A. (1994) *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 10383-10393.
34. Bromley, S. D., Ward, B. W., and Dabrowiak, J. C. (1986) *Nucleic Acids Res.* **14**, 9133-9148.
35. Ward, B. W., Skorobagaty, A., and Dabrowiak, J. C. (1986) *Biochemistry* **25**, 6875-6883.
36. Ward, B. W., Skorobagaty, A., and Dabrowiak, J. C. (1986) *Biochemistry* **25**, 7827-7833.

37. Thomas, A., Atreyi, M., and Rao, M. V. R. (1993) *J. Biomol. Struct. Dyn.* **11**, 67-81.
38. Thomas, A., Atreyi, M., and Rao, M. V. R. (1995) *Chem. Biol. Interact.* **97**, 199-214.
39. Brahms, S., Brahms, J., & Pilet, J. (1974) *Isr. J. Chem.* **12**, 153-163.
40. Quigley, G. J., and Rich, A. (1976) *Science* **194**, 796-806.
41. Sinden, R. R. (1994) *DNA structure and Function*, Academic Press, San Diego.
42. Saenger, W. (1984) *Principles of Nucleic Acid Structure*, Springer-Verlag, New York.
43. Baeyens, K. J., De Bondt, H., and Holbrook, S. R. (1995) *Nature Struct. Biol.* **2**, 56-62.

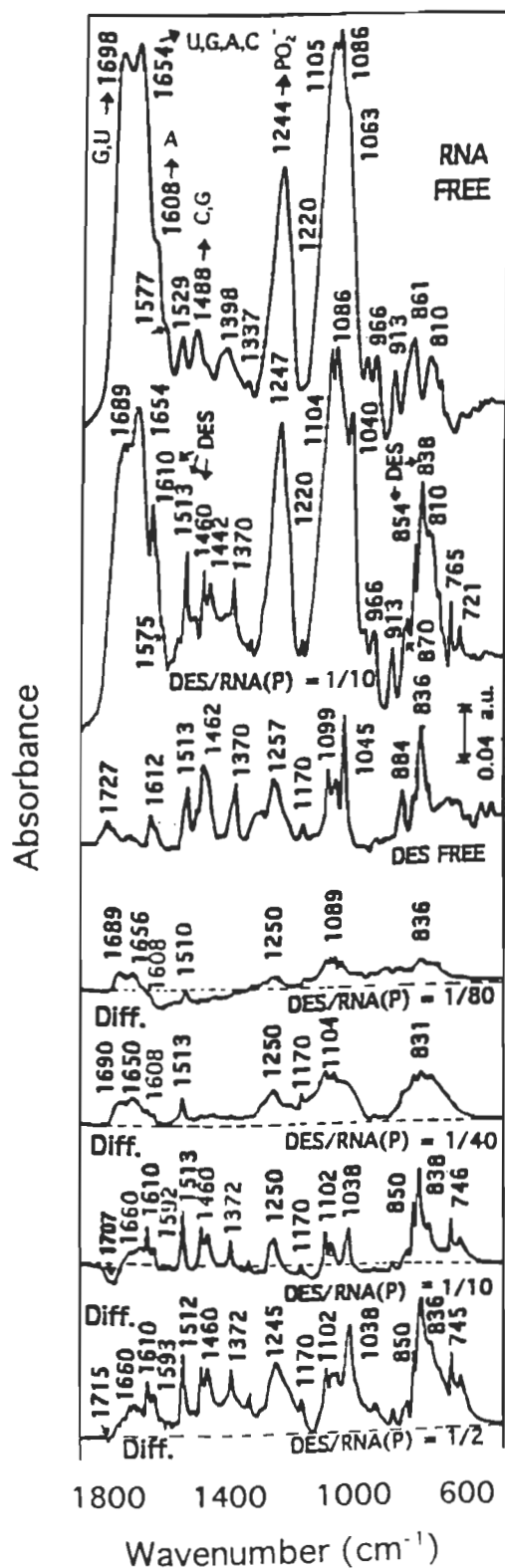


Figure 3.1 FTIR spectra (top three curves) and difference spectra [(RNA solution + DES solution) - (RNA solution)] (bottom four curves) of the free yeast RNA and its DES complexes in water-ethanol solution (50/50%) at pH = 7.30-6.80 with different drug /RNA (phosphate) molar ratios in the region 1800-600 cm^{-1} (the baseline shown as broken lines).

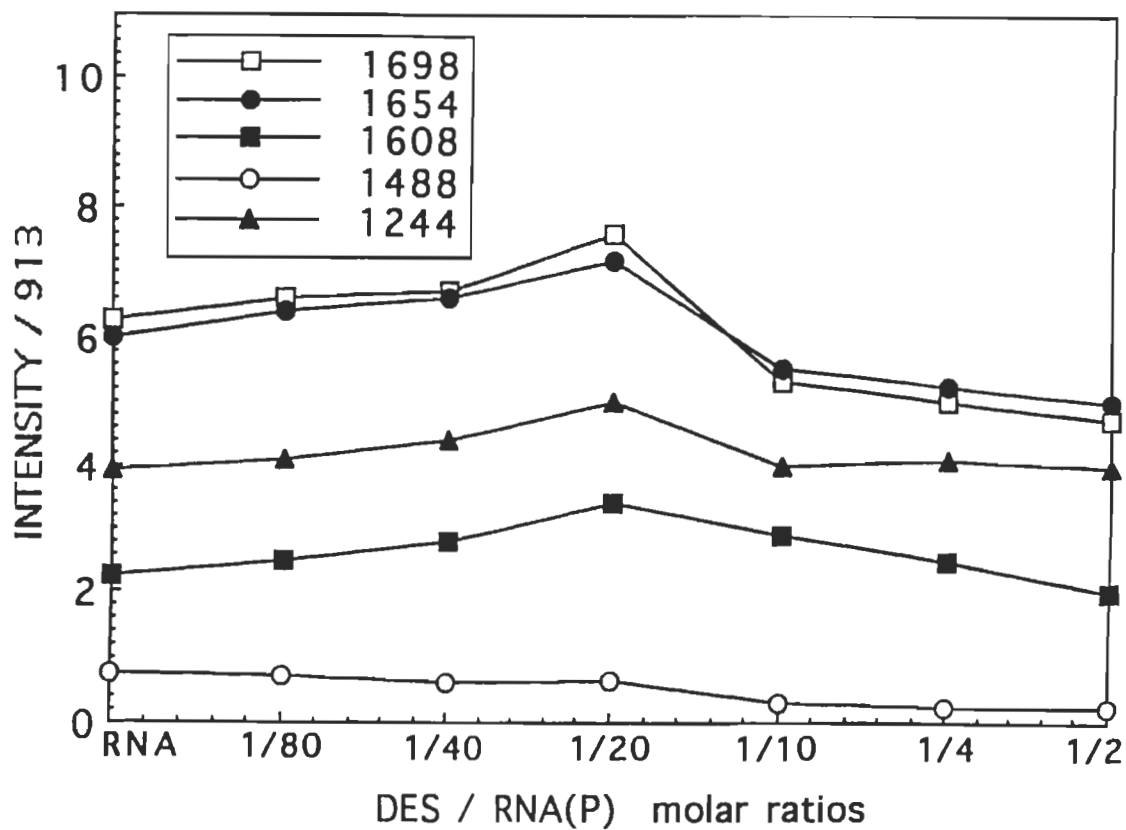


Figure 3.2 The calculated intensity ratio variations (with respect to the reference band at 913 cm^{-1}) for several RNA in-plane vibrations (cm^{-1}) at 1698 (G,U), 1654 (U,G,A,C), 1608 (A), 1488 (C,G) and 1244 (backbone PO_2 stretch) as a function of drug concentration (different DES/RNA(P) molar ratios).

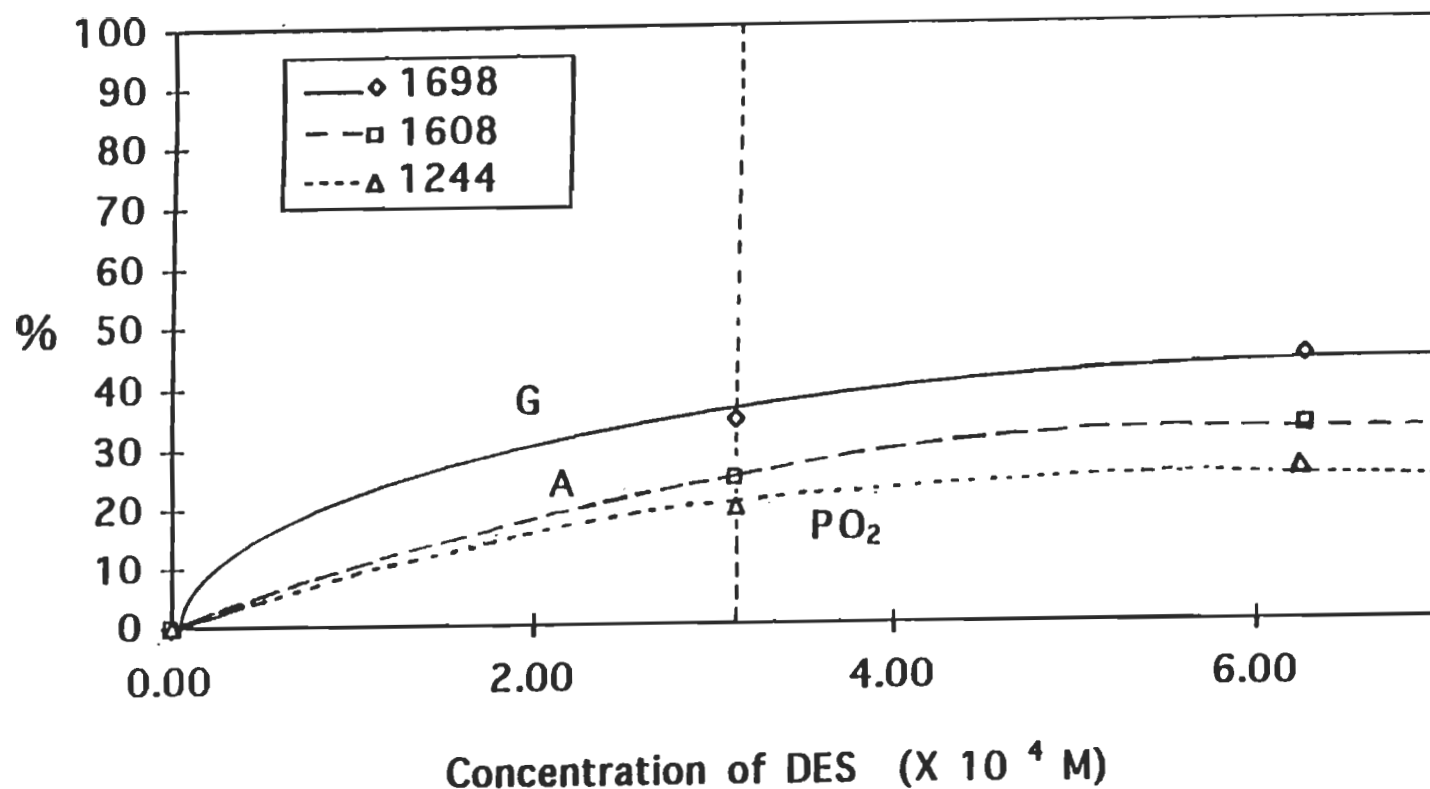


Figure 3.3 Distributions of the DES bound to the G-C and A-U regions (intercalated) and the backbone PO₂ group (external binding) calculated from the relative intensities of the 1698 cm⁻¹ (mainly G), 1608 cm⁻¹ (mainly A) and 1244 cm⁻¹ (backbone PO₂) bands in water-ethanol solution (50/50%) at pH 7.30-6.80 with RNA concentration of 0.025 M (phosphate) as a function of DES concentration (M).

CHAPITRE 4

CONCLUSION

4.1 Survol général:

En 1953, Watson et Crick découvraient l'ADN. Depuis, les connaissances concernant la structure des acides nucléiques, leur dynamique et les changements de conformation ont évolué d'une façon exponentielle. Ces connaissances ont conduit à des développements majeurs au niveau de l'industrie biotechnologique, à l'identification des plantes et des animaux à partir de quelques cellules ainsi qu'à plusieurs découvertes dans l'identification et le traitement de plusieurs maladies. Les interactions des acides nucléiques avec eux-mêmes, avec les protéines de même qu'avec divers ligands contrôlent les fonctions de ces acides. Jusqu'à ce jour, plusieurs méthodes physiques ont été utilisées afin de caractériser les structures primaires, secondaires et tertiaires des acides nucléiques. Il en est de même pour l'étude de leurs fonctions. (Tinoco, 1996)

La spectroscopie infrarouge par transformée de Fourier s'avère une excellente méthode de caractérisation structurale des composés biologiques. Parmi ses avantages, il faut reconnaître qu'elle nécessite seulement qu'une très petite quantité de produits. Par sa facilité de mise en œuvre tant au niveau du temps requis que du nombre d'étapes

(d'opérations), la spectroscopie FTIR représente un moyen rapide et relativement complet d'obtention de données biophysiques. En fait, peu de méthodes peuvent donner à la fois des informations sur les groupements fonctionnels impliqués dans des interactions biologiques de même que sur les changements de conformation des biomolécules. La spectroscopie FTIR est une méthode d'analyse à la fois quantitative et qualitative.

4.2 Comparaison des complexes DES-ARN avec d'autres systèmes acide nucléique-médicament:

Pour les complexes DES-ARN, aux plus faibles concentrations en DES, les données spectroscopiques présentées dans ce travail démontrent que la drogue s'intercale dans les paires A-U et G-C. De faibles interactions avec les groupements phosphates sont aussi observées. A de fortes concentrations en DES, une déstabilisation partielle de la structure hélicoïdale est observée. L'intercalation de la drogue ne provoque cependant aucun changement de conformation. La constante d'association se situe vers $8,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ faisant du DES un intercalant plus faible que le bleu de méthylène, l'orange d'acridine ou encore le bromure d'éthidium.

Des études complémentaires accomplies dans notre laboratoire pour les mêmes gammes de concentration permettent de situer le niveau des interactions DES-ARN par rapport à d'autres complexes. Ainsi pour les complexes chlorophylline-ARN, les sites de

liaison de même que les changements structuraux étaient les mêmes que pour les complexes DES-ARN. La constante d'association était de l'ordre de $2,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$. Pour les complexes chlorophylle-ARN, les paires G-C et A-U de même que les phosphates sont les cibles d'interaction. Cependant une déstabilisation majeure de l'hélice a été observée. La constante d'association se situe à $3,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$.

La structure plus rigide de l'ARN par rapport à l'ADN explique en grande partie les différences observées entre les complexes DES-ARN et DES-ADN. A de fortes concentrations en DES, un changement de conformation de l'ADN type-B vers l'ADN type-A est observé. Ces observations peuvent être aussi dues au caractère complet de la double-hélice de l'ADN comparé à l'ARN qui comporte une part de structure non-hélicoïdale.

4.3 Comparaison des complexes CHLN-ADN avec d'autres systèmes acide nucléique-médicament:

Concernant les complexes chlorophylline-ADN, les résultats publiés dans la présente étude démontre qu'à de faibles concentrations en chlorophylline ($r = 1/80$) cette dernière s'intercale dans les paires G-C et A-T avec de légères interactions avec les phosphates. A $r > 1/80$, une réduction partielle de conformation de l'ADN-B vers l'ADN-A est observée. A de hautes concentrations en chlorophylline ($r > 1/20$), une ouverture

partielle de la double hélice a lieu. La constante d'association (K) obtenue, affiche une valeur de $3,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ ce qui fait de la chlorophylline un intercalant faible à comparer aux autres porphyrines pour lesquelles les constantes sont généralement de l'ordre de 10^6 M^{-1} .

D'autres études menées dans notre laboratoire permettent de comparer la chlorophylline avec d'autres médicaments. Ainsi, pour les complexes chlorophylle-ADN, la principale cible d'interaction résidait surtout dans les groupements phosphates ainsi que quelques faibles interactions avec les paires A-T et G-C à de très hautes concentrations en drogue seulement. La valeur de la constante d'association a été évaluée à $1,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$. Il est à noter que l'affinité de l'ion magnésium avec les groupements phosphates est bien connue dans la littérature. De plus, alors que la chlorophylline forme des complexes planaires en milieu aqueux, la chlorophylle s'hydrate pour donner des complexes tridimensionnels qui s'intercalent difficilement.

Ajoutons les complexes vitamine C – ADN, la principale cible d'interaction reposant dans la paire A-T à de faibles concentrations en médicament. A cela, s'ajoute un changement de conformation de B vers A. A de hautes concentrations en vitamine C, les interactions s'étendent aux groupements phosphates puis à la paire G-C. La valeur de la constante d'association est de $4,0 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$.

4.4 Précision des mesures et validité des résultats:

Etant donné que le présent travail repose sur une seule technique soit la spectroscopie FTIR, il s'avère très important que les résultats soient reproductibles. Il est donc essentiel de mentionner que tous les spectres (et donc les variations d'intensité) ont été pris à au moins cinq reprises. Les écarts de 3 à 5 % dans les variations d'intensité proviennent de l'écart à la moyenne de ces cinq essais (ou plus). Il est donc possible de conclure à la reproductibilité des résultats.

Il ne faut pas perdre de vue que les changements observés sont parfois mineurs. C'est pourquoi il est impératif de s'en remettre à la fois au graphique de la variation d'intensité de même qu'aux spectres de différence ainsi qu'aux déplacements de fréquences. La combinaison des trois méthodes permet d'obtenir des résultats plus probants. Des allégations ne devraient jamais être faites à partir d'une seule technique. De plus, il ne faut pas oublier que les pourcentages de variation d'intensité mentionnés dans le texte sont toujours établis à partir de l'intensité initiale de chacune des bandes. Ils représentent aussi une moyenne approximative de la variation des bandes mentionnées. Il faut également dire que l'allure de la courbe est souvent plus significative que l'intensité des variations.

Les constantes d'affinité présentées dans ce travail se veulent avant tout des approximations. En effet, toute bonne méthode de calcul de ces constantes nécessite une connaissance très précise de tous les sites et modes possibles de liaison. En considérant un seul mode de liaison, le calcul de la constante d'affinité se veut davantage une estimation.

De même, la précision de la technique utilisée ne permet pas de déterminer exactement quels atomes d'une base donnée entrent directement dans les liaisons. Aucune des bandes indicatrices n'est parfaitement "pure". Il ne faut pas oublier que la détermination d'une telle constante se veut un complément au présent travail. Le but était de situer l'ordre de grandeur des liaisons (intercalation) par rapport à d'autres composés connus.

Il est vrai que les concentrations en médicaments utilisées dans ce travail sont supérieures à ce qui existe *in vivo*. Cependant le but du travail est avant tout de déterminer quels sont les sites de liaison. En utilisant des concentrations d'ordre biologique, il est quasi impossible d'obtenir des résultats spectroscopiques significatifs, les variations d'intensité et de fréquence étant trop petites. Les concentrations en médicament sont volontairement augmentées afin de pouvoir déterminer quels sont les sites de liaison, les concentrations en médicament nécessaires afin de provoquer un changement de conformation des acides nucléiques et le mode de liaison du médicament. Le travail est avant tout "théorique". La manière dont le médicament parvient à l'acide nucléique, les conditions d'administration du médicament de même que les effets biologiques de telles concentrations relèvent d'une autre problématique.

4.5 Avenir de la spectroscopie FTIR:

La physico-chimie comporte plusieurs méthodes d'analyse structurale. Parmi ces dernières citons la cristallographie, la résonance magnétique nucléaire de même que les spectroscopies dans l'ultraviolet (U.V.) et l'infrarouge. Il paraît alors impératif que ces

méthodes soient appliquées à la résolution de problèmes de nature biologique. A la question: "Ceci n'a-t-il pas déjà été fait d'une manière ou d'une autre?" répondons que chaque petite découverte amène généralement de grands questionnements... Ainsi pour le futur, la question à se poser sera de savoir ce que le biophysicien peut faire pour le neurobiologiste, le biologiste, le physiologiste de même que le généticien et le pharmacologiste. (Tinoco, 1996) Un des défis qu'attend donc la spectroscopie infrarouge consistera en l'analyse des complexes protéines-acides nucléiques et ligands-acides nucléiques et ce, *in vivo*. Jusqu'à ce jour, il demeure encore difficile d'interpréter de tels spectres. Cependant, des découvertes récentes dans ce domaine laissent entrevoir des perspectives intéressantes.

4.6 Perspectives de recherche:

Concernant les nouveaux médicaments anticancer potentiels, des études récentes ont démontré que plusieurs constituants retrouvés dans les fruits et légumes possèderaient des effets inhibiteurs sur la carcinogénèse. Parmi ceux-ci notons les anti-oxydants tels que: la vitamine C, la bêta-carotène, la vitamine E, le sélénium, etc... Ces composés peuvent intervenir à plusieurs niveaux et de plusieurs façons. Leur mécanisme d'action est donc complexe et demeure inconnu jusqu'à ce jour. Les composés extraits des fruits et légumes et leurs interactions avec les diverses molécules biologiques représenteront donc un sujet d'une importance capitale pour le futur. (Sarma & Sarma, 1988)

4.7 Bibliographie:

Bellamy, L.J. Advances in Infrared Group Frequencies London: Chapman and Hall Ltd., 1975.

Klotz, I.M. et Hunston, D.L. Properties of graphical representations of multiple classes of binding sites Biochemistry, 1971, 10, 3065-3069.

Lavalle, N., Lee, S.A. et Rupprecht, A. Counterion effects on the physical properties and the A to B transition of calf-thymus DNA films. Biopolymers, 1990, 30, 877-887.

Lipscomb, L.A., Zhou, F.X., Persnell, S.R., Woo, R.J., Peek, M.F., Plaskon, R.R. et William, L.D. Structure of a DNA-porphyrin complex. Biochemistry, 1996, 35, 2818-2823.

Pasternack, R.F., Gibbs, E.J. et Villafranca, J.J. Interactions of porphyrins with DNA. Biochemistry, 1983, 22, 5409-5417.

Pavia, D.L., Lampman, G.M. et Kriz, G.S. Jr. Introduction to spectroscopy. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1979.

Sandorfy, C. et Theophanides, T.(Eds.) Spectroscopy of Biological Molecules Dordrecht: D. Reidel Publishing Company, 1983.

Sarma, R.H. et Sarma M.H. DNA Double Helix & The Chemistry of Cancer Guilderland: Adenine Press Inc., 1988.

Skoog, D.A. Principles of instrumental analysis (3rd ed.). Philadelphia: CBS College Publishing, 1985.

Spiro, T.G. (Ed.) Biological Applications of Raman Spectroscopy New-York: John Wiley and Sons, 1987.

Taillandier, E., Liquier, J. et Taboury, J.A. Advances in Infrared and Raman Spectroscopy New-York: Wiley, 1985.

Tajmir-Riahi, H.A., Ahmad, R., Naoui, M. et Diamantoglou, S. The effect of HCl on the solution structure of calf-thymus DNA: a comparative study of DNA denaturation by proton and metal cations using Fourier transform infrared difference spectroscopy. Biopolymers, 1995, 35, 493-501.

Tajmir-Riahi, H.A., Langlais, M. et Savoie, R. A laser Raman spectroscopic study of the interaction of the methylmercury cation with AMP, ADP and ATP. Biochim.Biophys. Acta, 1988, 956, 211-216.

Theophanides, T. (Ed.) Fourier Transform Infrared Spectroscopy (1st ed.) Dordrecht: D. Reidel Publishing Company, 1984.

Tinoco, I. Jr Nucleic acid structures, energetics and dynamics. J.Phys.Chem., 1996, 100, 13311-13322.

Tuite, E. et Kelly, J.M. The interaction of methylene blue, azure B, and thionine with DNA: Formation of complexes with polynucleotides and mononucleotides as model systems. Biopolymers, 1995, 35, 419-433.